М. С. ШУЛЬМАН

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ



М. С. ШУЛЬМАН

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ»
Москва · 1967

УДК 577.15.07

В книге излагаются физнко-химическне закономерности технологических процессов производства ферментных препаратов. Кратко описывается механизм ферментативных реакций и рассматрнваются основы физико-химии биополнмеров.

Обосновываются физико-химнческне процессы извлечення ферментов из культур плесневых грибов и раскрываются основные закономерности очистки и выделения ферментов. Даны теоретические положения сорбцни ферментов ионитами, представлены перспективы способа сорбции ферментов для нх очистки и концентрирования.

Излагается теория осаждения ферментов органнческими растворнтелями и электролитами. Кратко опнсываются основы перегонки спирта, применяемого для осаждения ферментов и регенерируемого в процессе производства ферментов. Даются теоретические основы упаривания растворов ферментов, сушки, а также стабилизацни, стандартизации и хранения ферментных препаратов.

Книга рассчитана на ннженерно-технических работников ферментной промышленностн и работников научно-исследовательскнх учреждений.

Рецензент д-р биол. наук проф. *А. С. ЦЫПЕРОВИЧ*

Марк Соломонович Шульман

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОИЗВОДСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Редактор *А. И. Ковалевская*
Худ. редактор *С. Р. Нак*
Художиик *И. Н. Котлерман*
Техн. редактор *Н. И. Фёдорова*
Корректор *Г. М. Иванова*

Т-10128 Сдаио в набор 22/XII 1966 г. Подписаио к печати 19/VII 1967 г.
Формат 60×90[1]/16 Объем 11,5 п. л. Уч.-изд. л. 11,58 Тнраж 3 000 Бум. тип. № 2
Издат. № 4503 Заказ 980 Т. п. 1967 п/№ 30 Цена 68 к.

Московская тнпография № 6 Главполнграфпрома
Комнтета по печати при Совете Министров СССР
Москва, Ж-88, 1-й Южно-портовый пр., 17.

3-17-8
30-67

ПРЕДИСЛОВИЕ

Создание и развитие ферментной промышленности в СССР вызывает необходимость издания ряда руководств и монографий для работающих в этой новой, многообещающей отрасли народного хозяйства.

Автор стремился последовательно изложить физико-химические процессы, лежащие в основе производства ферментных препаратов.

В первой главе даются общие понятия о типах химических связей, основные представления о механизме ферментативных реакций и их общие схемы. На основе законов термодинамики и химической кинетики кратко изложена теория активации молекул, кинетика ферментативного процесса и влияние температуры и реакции среды на биокаталитические процессы.

В общих чертах даются представления об основах физикохимии биополимеров.

Во второй главе излагаются физико-химические процессы извлечения ферментов из культур плесневых грибов, выращенных поверхностным и глубинным методами, и раскрываются основные закономерности извлечения и интенсификации экстрагирования ферментов.

Вопросы культивирования и биосинтеза ферментов, а также селекции продуцентов, нами не рассматриваются.

Третья глава посвящена физико-химии очистки и фракционирования ферментов. Вначале даются общие приемы фракционирования белков и излагается теория процесса диализа белковых растворов. Обращается внимание на влияние распределения электролитов при диализе, а также на освобождение от балластных веществ путем изменения pH вытяжек (экстракт культур плесневых грибов), и обесцвечивание ферментных растворов некоторыми ионитами. Здесь же приведены принципиальные схемы получения высокоочищенных ферментных препаратов.

Придавая большое значение концентрированию ферментов методом сорбции различными ионитами, который находит все большее распространение в практике научных исследований и будет использован в ферментной промышленности, в четвертой главе изложены теоретические положения сорбции и на основе имеющегося экспериментального материала показана целесооб-

разность сорбции амилазы культуральной жидкости высокодисперсным силикагелем и применения других ионитов для очистки и концентрирования ферментов. Показана перспективность метода сорбции для ферментной промышленности.

В пятой главе излагается теория осаждения ферментов органическими растворителями и электролитами. Показано влияние химической природы органических растворителей и изложен механизм действия органических растворителей и электролитов на осаждение ферментов. Здесь же кратко описываются теоретические основы перегонки спирта, применяемого для осаждения ферментов и регенерируемого в процессе производства ферментов.

В шестой главе даны теоретические основы упаривания растворов ферментов и сушки ферментных препаратов.

Последняя, седьмая глава посвящена вопросам стабилизации, стандартизации и хранения ферментных препаратов.

Излагая физико-химические основы производства ферментных препаратов, автор отчетливо представлял, что данная книга является лишь кратким теоретическим обобщением этого сложного технологического процесса, в котором диалектически глубоко взаимосвязаны закономерности биологии, физики, химии в их широком аспекте.

Мы уверены, что дальнейшее развитие исследований в области физико-химии ферментов и изучение с этих позиций технологии производства ферментных препаратов позволит правильно совершенствовать производство биологических катализаторов, которые будут все шире проникать в различные отрасли народного хозяйства, медицину и в практику научных исследований.

Автор надеется, что знакомство читателей с книгой будет способствовать расширению познания в области физико-химических закономерностей процессов производства ферментных препаратов.

Автор с благодарностью примет все замечания, относящиеся к данной книге.

ВВЕДЕНИЕ

Производство ферментных препаратов грибного или бактериального происхождения базируется на следующих основных процессах: культивировании продуцентов ферментов (ферментации) и очистке ферментных растворов (экстракта или культуральной жидкости) и их концентрировании, выделении ферментов с последующим высушиванием и стандартизации ферментного препарата.

Основные принципы технологии производства ферментов являются общими для различных ферментов как бактериального, так и грибного происхождения.

В исходном сырье животного или растительного происхождения содержится комплекс соответствующих ферментов, образовавшихся при жизни животного или растения.

Все биохимические процессы, протекающие в живой природе, в основе имеют ферментативный характер.

Ферментативный катализ обладает исключительно большой способностью (в тысячи и миллионы раз) ускорять биохимические реакции.

В настоящее время известно более 1200 различных ферментативных реакций, используемых в различных отраслях промышленности и в научных исследованиях.

В результате ферментных реакций в промышленном масштабе получают различные органические растворители, глицерин, органические кислоты, например глюконовую, фумаровую, глютаминовую и др. Ферментативные реакции позволяют создавать определенные соединения, обладающие большой специфичностью.

С каждым годом возрастает значение ферментных препаратов в различных отраслях промышленности и расширяется область их применения, а следовательно, и разнообразие используемых ферментов.

Применение препаратов ферментов способствует повышению эффективности и рентабельности многих отраслей промышленности.

С помощью ферментов удается получить необходимые ценные свойства пищевых продуктов (вкус, аромат, внешний вид), а также интенсифицировать процесс их обработки.

Имеются все основания полагать, что ферментные препараты

будут широко использованы в комбикормовой промышленности в качестве добавок к кормам, а также для предварительной обработки грубых кормов.

Большое значение для научных исследований, а также для медицины и фармацевтической промышленности будут имсть высокоочищенные и кристаллические ферменты.

В последние годы начались поиски возможности использования ферментов для диагностики и терапии многих заболеваний, т. е. ферментология входит в клиническую практику.

Развитие научных исследований и создание ферментной промышленности будут способствовать коренному изменению технологии многих отраслей промышлснности, так как использование ферментов явится важным фактором химизации производства, повышения производительности труда и снижения себестоимости выпускасмой продукции.

Глава I

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

ТИПЫ ХИМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ

Для выяснения механизма, лежащего в основе каталитического действия ферментов, необходимо прежде всего кратко остановиться на природе химической связи органических соединений.

Современные представления о строении атомного ядра основываются на том, что электроны должны находиться в определенных областях пространства около ядер. Они не могут двигаться вокруг атомных ядер по определенным круговым или эллиптическим орбитам, так как для таких частиц как электроны невозможно одновременно определить скорость, положения и направления движения (принцип «неопределенности» Гейзенберга).

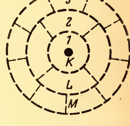


Рис. 1. Схема строения атомной электронной оболочки.

Область движения электронов вокруг атомных ядер можно изобразить набором ячеек (рис. 1).

Свойства химических элементов определяются структурой системы ячеек, которые, группируясь, образуют так называемую оболочку, являющуюся энергетическим уровнем определенного атома.

Пространственно разделенные между собой энергетические уровни называются квантовыми уровнями и обозначаются начиная от ядра цифрами 1, 2, 3, 4,... или соответственно буквами *K, L, M, N* и т. д.

Число ячеек, содержащихся внутри оболочки, определяется соотношением $z=n^2$, где z — число ячеек, а n — номер оболочки.

Каждый электрон находится на определенном энергетическом уровне. Электроны, располагающиеся на ближайших к ядру оболочках, обладают низким уровнем энергии. Для перевода их с одного более низкого уровня на другой, более высокий, затрачивается квант энергии, а при обратном переходе электрона на более низкий энергетический уровень происходит испускание кванта энергии.

Каждая оболочка (за исключением первой) состоит из подоболочек, число которых равно главному квантовому числу данной оболочки. Подоболочки состоят из основных энергетических уровней или орбит, представляющих собой объем, занимаемый электронным облаком, обладающим трехмерной конфигурацией.

Количество орбит, представляющих оболочку, равно квадрату главного квантового числа, а общее число электронов, находящихся на определенной оболочке, численно равно удвоенному квадрату главного квантового числа.

Конфигурация электронного облака зависит от положения орбиты, на которой находится электрон.

Так, оболочка K состоит из одной ячейки, L — из четырех, M — из девяти ячеек.

Состояние электрона в атоме определяется так называемыми четырьмя квантовыми числами.

Главное квантовое число n определяет энергию электрона. Квантовое число l характеризует момент количества движения электрона, а квантовое число m показывает ориентацию орбиты электрона по отношению к внешнему магнитному полю. Помимо этого, движение электрона определяется также и квантовым числом s, которое представляет собой момент количества движения электрона, обусловленного вращением вокруг собственной оси (спи́на).

Квантовые числа l, m и s должны отвечать следующим положениям: l — не может быть больше, чем главное квантовое число n минус единица ($l \leq n-1$), m принимает $2l+1$ различных значений, а s лежит в пределах от $+\frac{1}{2}$ до $-\frac{1}{2}$.

В соответствии с принципом Паули в атоме не может быть двух электронов, у которых все четыре квантовых числа были бы одинаковы.

Главное квантовое число n указывается впереди цифрой (или буквой K, L, M, N и т. д.), а квантовые числа l (0,1, 2,3) обозначаются s, p, d, f и др. Таким образом, цифра перед каждой буквой показывает номер квантового уровня, а буква — подуровень (подоболочка). Распределение электронов в атоме водорода ($n=1$ и $l=0$) соответствует $1s'$, для атома гелия ($n=2$, $l=0$ и 1) — $2s^2$. В атоме может быть $2n^2$ электронов, где n — главное квантовое число.

Связь между атомами происходит всегда за счет двух валентных электронов, которые становятся общими для двух атомов. Таким путем образуются связанные между собой электронные пары (электронный дублет). Данное положение послужило основой для так называемой октетной теории или теории электронных пар.

Если представить электроны точками, то молекула водорода изобразится H : H, метана

$$\begin{matrix} & H & \\ H & :\ddot{C}: & H \\ & \ddot{H} & \end{matrix}$$

На основе указанных положений рассмотрим типы химических связей.

Ковалентная связь. Ковалентная связь может быть неполярной и полярной. Если дублетное взаимодействие происходит между одинаковыми атомами (гомеополярными), например H : H; Cl : Cl или в общем виде A : A, то такая связь называется неполярной ковалентной связью. Следует указать, что с увеличением числа связующих электронов связь становится прочнее. Так, для связи H : H энергия химической связи равна 102,6 *ккал/моль*, для O : : O — 117,2 *ккал/моль*. В неполярных молекулах электрические центры тяжести положительных и отрицательных зарядов совпадают.

Полярная связь происходит за счет электронного дублета различных атомов, например H : Cl; H : Br. В полярных молекулах электрические центры тяжести не совпадают.

На свойствах полярных молекул мы подробнее остановимся в главе V.

Ионная (гетерополярная, или электровалентная) связь. Данный вид химической связи характерен для элементов, образующих разноименно заряженные (гетерополярные) ионы, например K^+ — Cl; Na^+ — Br и др. Следовательно, гетерополярная или ионная связь является результатом электростатического (кулоновского) взаимодействия зарядов атомов или атомных групп. Данный вид связи может также являться результатом взаимодействия между ионом и молекулой, обладающей постоянным или наведенным диполем.

Координационная связь. Ковалентная химическая связь, образуемая за счет электронной пары только одной из реагирующих частиц, т. е. в обобществлении неподеленного электронного дублета одного из атомов, носит название координационной, или донорно-акцепторной связи (Льюис и Саджвик).

Донором называется атом или ион, отдающий неподеленный электронный дублет для образования химической связи, а акцептором — атом или ион, который заполняет незаконченную структуру электронного слоя (оболочка) за счет неподеленного дублета донора. Например, катион H^+ образует с молекулой воды катион гидроксония $H^+ + H_2O = H_3O^+$. В данном примере обобществляется электронный дублет атома кислорода, т. е. кислород является донором, а водород — акцептором.

Ковалентная связь образуется главным образом за счет обобщения электронов двух отдельных атомов (по правилу

октета): :C̈l: + :C̈: → :C̈: :C̈l: или в комплексных соединениях. Направление смещения электронов изображается изогнутыми стрелками.

Водородная связь. Так как у иона водорода H^+ отсутствуют электронные оболочки, то он (ион водорода) способен притягиваться к другим атомам без электронного взаимо-

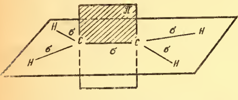


Рис. 2. Схема расположения σ- и π-связей в молекуле этилена. Заштрихована плоскость π-связи, перпендикулярная плоскости σ-связей молекулы.

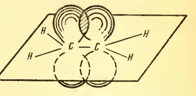


Рис. 3. Схема строения π-связи

действия. Ион водорода может даже проникать в электронные оболочки других атомов (образование гидроксония), при взаимодействии с NH_3 образует NH_4^+, довольно прочно взаимодействует с электроотрицательными элементами (F, O, Cl, N и др.). Данный вид связи называется водородной связью, которая обусловливается донорно-акцепторной связью и обозначается тремя точками. Ион водорода — акцептор, а донор — электроотрицательный атом другой молекулы. Энергия водородной связи лежит в пределах 5—10 *ккал/моль*, т. е. примерно в 10 раз меньше энергии обычной химической связи.

Электронное облако s-электрона имеет форму шара, p-электрона — форму объемной восьмерки.

Простая ковалентная связь между двумя s-электронами (H_2) образует так называемую σ-связь, а электроны, ее образующие, σ-электронами, Так, в молекуле этана семь σ-связей

```
  σ       σ
H\        /H
  σ   σ  σ
H—C — C—H
  σ      σ
H/        \H
```

в молекуле этилена каждый углеродный атом имеет по одному неспаренному электрону

```
H\σ   σ  σ/H
  σC — Cσ
H/        \H
```

Связь, образованная за счет неспаренного электрона, называется π-связью (рис. 2). π-Связь является результатом перекрывания электронных облаков объемной восьмерки (рис. 3).

π-Электроны, образующие π-связь, обладают большей поляризуемостью, чем σ-связь.

Изогнутая стрелка дает представление о направлении смещения (поляризации), например $>C\overset{\frown}{=}O^-$.

Поляризация π и σ-связи приводит к тому, что углеродный атом становится положительно заряженным и атом (неполностью) приобретает положительный заряд, а кислородный атом приобретает неполный отрицательный заряд.

Полярность связи обусловливается электроотрицательностью атомов, образующих эту связь. С увеличением электроотрицательности возрастает способность к притяжению электронов.

Легкая поляризуемость π-связи приводит к взаимодействию обобществленных π-электронов двух или нескольких связей, что вызывает сопряжение связей. Наличие двойных сопряженных связей вызывает не только статическое сопряжение, но и приводит к динамическому эффекту сопряжения.

Таким образом, явление сопряжения связей является следствием определенного взаимодействия атомов.

Рассматриваемое явление весьма важно, как мы увидим далее, при объяснении механизма ферментативных реакций.

МЕХАНИЗМ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Первые гипотезы о механизме действия ферментов основывались на законах гетерогенного и гомогенного катализа; затем появились теории, в основе которых лежали представления о цепных реакциях и роли свободных радикалов в биологическом катализе. На основе современных спектрофотометрических данных установлено, что первым этапом ферментативной реакции является взаимодействие фермента с субстратом (или субстрата с ферментом), в результате чего образуется лабильный промежуточный комплекс, который может находиться как в диссоциированном, так и в недиссоциированном состоянии.

Фермент-субстратный комплекс образуется не только ковалентными и координационными связями, но и за счет водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных неполярных участков молекул.

В связи с тем что ферменты обладают строгой специфичностью действия, вполне обоснованно положение о структурном соответствии между пространственной конфигурацией молекулы субстрата и активным центром фермента.

Необходимо отметить, что в образовании фермент-субстратного комплекса участвует несколько функциональных групп фермента, но только некоторые пары из них (субстрата и фермента) ответственны за ферментативный катализ, а другие группы служат для создания связи фермента с субстратом.

Следующим этапом ферментативной реакции является пре-

образование данного ковалентного соединения в комплекс фермента с образуемыми конечными продуктами ферментативной реакции.

Последний этап ферментативного процесса, который может протекать в несколько стадий, заключается в отделении продуктов реакции от фермента.

На рис. 4 (взятом из статьи Браунштейна) показано изменение, происходящее при взаимодействии фермента с субстратом. Как видно, после связывания фермента с субстратом часть молекулы *AB* располагается дальше, чем в исходной молекуле, что приводит к растяжению и ослаблению связи (рис. 4).

Рис. 4. Схема напряжения ковалентной связи в фермент-субстратном комплексе.

Объяснение механизма ферментативного процесса обычно приводится на примере действия ацетилхолинэстеразы.

Активный центр ацетилхолинэстеразы состоит из реактивного «эстеразного» участка, связывающего и расщепляющего эфирную связь субстрата, и анионного участка, представляющего собой свободные карбоксильные группы, взаимодействующие с положительно заряженной группой ацетилхолина или других азотистых оснований. Фермент взаимодействует с субстратом следующим образом. Ацетильная группа ацетилхолина ориентируется к эстеразному участку активного центра, а основной атом азота располагается против анионного участка фермента. При этом происходит образование ацилэнзима, который распадается на свободный фермент холин и уксусную кислоту (рис. 5).

Большинство ферментативных процессов является следствием дефицита электронов в гидролизуемой связи. Подвижные π-электроны определяют основные физико-химические свойства фермента и субстрата.

Необходимо отметить, что гликозидная связь отличается от других гидролизуемых связей тем, что в ней участвуют только σ-электроны и не участвует система π-электронов. Таким образом, при ферментативном гидролизе гликозидной связи происходит поляризация только σ-электронов.

Вследствие индукционного эффекта в центральном атоме кислорода происходит некоторая дополнительная концентрация электронного заряда, что приводит к приобретению им отрицательного заряда, а присоединенные атомы углерода обладают дефицитом электронов (становятся частично положительными).

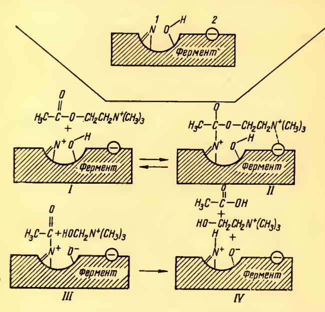


Рис. 5. Механизм действия ацетилхолинэстеразы:
I — исходное состояние, *II* — промежуточный комплекс, *III* — ацил-фермент, *IV* — конечное состояние; *1* — эстеразный центр, *2* — анионный центр.

В пептидной группе сопряжение осуществляется между парой π-электронов C=O-связи и неподеленной парой электронов соседнего атома азота.

Гибкость пептидной цепи в растворе обусловлена свободой вращения простых связей C — C и C — N, стремящихся принять конфигурацию клубка.

Между карбонильными и имидными группами пептидной цепи возникают водородные связи $>C=O \ldots H-N<$, что и приводит к пространственной конформации, т. е. к образованию вторичной структуры белка. Основной конфигурацией является α-спираль, в которой водородные связи соединяют NH-группу одной пептидной связи с CO-группой другой связи, находящейся от первой связи на один виток спирали.

Б. и А. Пюльман отмечают, что практически во всех типах основных биохимических субстратов гидролизуемая ферментами

связь образована атомами, обладающими суммарным положительным зарядом.

Например, пептидная связь состоит из скелета, локализованных σ-электронов — одинарной связи с системой подвижных π-электронов.

Распределение зарядов в пептидной связи можно представить следующим образом:

$$R_1 - \overset{\overset{\displaystyle O^-}{\|}}{C} = \underset{\underset{\displaystyle H}{|}}{N^+} - R_2$$

Из четырех электронов — два электрона двойной связи C=O и два электрона неподеленной пары атома азота.

По данным указанных авторов, заряды в пептидной связи распределяются следующим образом:

$$\underset{+0,256}{R_1 -} \overset{\overset{\displaystyle -0,397}{\overset{\displaystyle O}{|}}}{C} - \overset{+0,141}{\underset{\underset{\displaystyle H}{|}}{N}} - R_2$$

Наличие так называемой двухположительной связи указывает на дефицит π-электронов на атомах, образующих данную связь.

Кроме поляризации π-электронов, возникает также поляризация электронов σ-связи, которая может быть направлена противоположно направлению поляризации π-электронного облака. π-Электроны значительно менее прочно связаны, чем σ-электроны, и поэтому имеют большое значение в биохимических (ферментативных) процессах.

Остатки глюкозы в крахмале связаны α-глюкозидными связями, а в целлюлозе β-глюкозидными связями.

Целлюлоза является аналогом, точнее, изомером (при сравнении участков цепей равной длины) амилозы. Соседние глюкозные звенья в цепочке целлюлозы повернуты одно по отношению к другому на 180°, в связи с чем целлюлоза несравненно устойчивее амилозы в отношении гидролиза ферментами и кислотами.

Линейные молекулы целлюлозы упакованы в виде длинных и очень прочных пучков.

Структурные формулы целлюлозы и крахмала могут быть представлены следующим образом.

Целлюлоза

Амилоза крахмала

Амилопектин крахмала

Помимо полипептидной и глюкозидной связей, укажем на некоторые другие связи, имеющие существенное значение в биохимических реакциях:

связь в аминах $-\overset{|}{\underset{|}{C}}-NH_2$

связь в гуанидинах $-N-H-C \lessgtr$

эфирная связь в эфирах карбоновых кислот

$$R_1-C\begin{matrix}\nearrow O \\ \searrow O-R_2\end{matrix}$$

связь в фосфатах

$$-\underset{\diagdown}{\overset{\diagup}{P}}-O-\underset{\diagdown}{\overset{\diagup\!\!\diagup O}{P}}$$

Браунштейн, обстоятельно описывая процесс механизма действия ферментов, указывает, что первая стадия образования лабильного промежуточного комплекса протекает энергичнее (быстрее других стадий). Ниже мы остановимся на кинетике ферментативных реакций.



Рис. 6. Изменение энергетического барьера химической реакции.

Высокая скорость первой стадии процесса обусловлена тем, что в образовании фермент-субстратного комплекса участвуют слабые типы связей.

Образование фермент-субстратного комплекса проходит, как правило, в стерическом соответствии молекулы субстрата и фермента. Фишер указывал, что фермент и субстрат должны подходить друг к другу как ключ к замку, но это стерическое соответствие не может являться, естественно, обоснованием ферментативной реакции.

Преобразование субстрат-ферментного комплекса в комплекс фермента с конечными продуктами реакции обусловлено изменением ковалентных связей: их разрывом, замыканием и преобразованием.

Этот процесс может также протекать в несколько стадий. Действие ферментов вызывает снижение энергии активации.

Снижение энергетического барьера химической реакции может быть представлено графически (рис. 6).

Как уже отмечалось, в каталитическом процессе участвуют только некоторые группы фермента и субстрата, но без взаимодействия других групп невозможен процесс участия активных групп, так как они способствуют повышению активности промежуточного комплекса.

Это повышение активности обусловлено изменением структуры электронного облака комплекса (π—π-связи или σ — π-связи).

Активный центр фермента. Браунштейн указывает, что нельзя отделить активный центр фермента от остальных частей его молекулы, поскольку в целом они создают трехмерную конформацию и тем самым оказывают влияние на ферментативный процесс.

Кошленд считает необходимым включить в активный центр фермента также «вспомогательные», более отдаленные группы,

обеспечивающие соответствующую конформацию и физические свойства молекулы фермента.

Тем самым «активный центр фермента» должен представлять собой все группы фермента, которые образуют активированный фермент-субстратный комплекс.

Таким образом, теория Кошленда предполагает возникновение принудительной комплементарности при сближении субст-

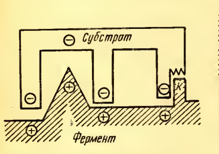


Рис. 7. Принцип фермент-субстратного контакта:
K — каталитическая группа фермента, ^^^^ — связь между атомами субстрата, подлежащая разрыву.

Рис. 8. Фермент-субстратный комплекс (пептидаза).

рата с активными центрами фермента, приводящее к изменению структуры (конформации) молекул как субстрата, так и самого фермента.

Эта теория дает возможность расширить представления о ферментативном катализе и объяснить механизм ингибирования и активации ферментов.

Исследования кинетики ферментативных реакций выявили, что некоторые ферменты должны обладать ионами металлов для соединения фермента с субстратом, а для других ферментов металлы являются основным компонентом активного центра.

Многие ферменты содержат в молекуле катионы двух- или трехвалентных металлов, которые связаны с функциональными группами в виде хелатных комплексов. Наличие ионов металлов в молекуле некоторых ферментов дает основание предполагать, что координационный комплекс функциональных групп с атомами металла обусловливает необходимую конфигурацию молекулы фермента и субстрата. Известно, например, что ион кальция способен агрегировать молекулы белка и, в частности, обусловливает активность α-амилазы. Ионы металла выступают в роли акцептора электронов, а донорами в этом процессе являются атомы азота, кислорода, серы.

В результате данного процесса происходит отток электронов из отдельной связи субстрата.

Изменение конформации фермент-субстратного комплекса представляется следующим образом (рис. 7).

На изменение электронной структуры субстрата расходуется энергия активации.

В оттоке электронного облака внутри молекулы субстрата и заключается в основном механизм действия ферментов.

Приведем некоторые примеры действия фермента. Фермент пептидаза, в молекулу которого входит ион Co (рис. 8), образует координационную связь Co...O. В результате происходит отток электрона из связи C — N.

Общая схема механизма ферментативного процесса дана Браунштейном.

Так как ферментативный катализ приводит к снижению энергии активации, то следует хотя бы кратко остановиться на основных положениях термодинамики и кинетики ферментативных реакций.

ТЕРМОДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Термодинамика оперирует следующими понятиями: изолированная система — термодинамическая система, не участвующая в обмене энергии с окружающей средой. Полный внутриатомный запас энергии системы называется внутренней энергией. В соответствии с законом сохранения энергии $\Delta H = 0$, где ΔH — изменение внутренней энергии системы. Приращение внутренней энергии системы определяется поглощением системой тепла dQ за вычетом работы ΔA (первое начало термодинамики)

$$dH = dQ - dA.$$

Второе начало термодинамики указывает, что тепло не может самопроизвольно переходить от холодного тела к более теплому, независимо от превращения энергии в промежуточных процессах.

Перемещение энергии того же вида происходит от системы с более высоким потенциалом к системе с более низким потенциалом, до наступления термодинамического равновесия.

В термодинамике различают связанную и свободную энергию. Внутренняя энергия системы, представляющая собой сумму свободной и связанной энергии, не может быть полностью превращена в работу. В процессе совершения работы убывает только свободная энергия. С целью определения степени обратимости перехода энергии при различных процессах в термодинамике введена функция состояния, называемая энтропией, которая обозначается буквой S. Энтропия зависит от абсолютной температуры.

Если при изотермическом процессе совершается внешняя работа и поглощается извне при абсолютной температуре тепло,

то отношение количества подводимого тепла к абсолютной температуре дает величину энтропии, не зависящую от направления обратимого процесса:

$$dS = \frac{dQ}{T}.$$

Произведение абсолютной температуры тела на его энтропию называется связанной энергией, т. е. $G = TS$. Следовательно, свободная энергия

$$F = H - TS.$$

Если система, прошедшая ряд обратимых процессов, переходит из состояния *1* в состояние *2*, то увеличение энтропии выразится как

$$\int_1^2 \frac{dQ}{T} = S_2 - S_1 = \Delta S.$$

В физических и химических процессах пользуются разностью энергии и энтропии, т. е. $\Delta G = T\Delta S$, или $dH = TdS - dA$. Это уравнение связывает первое и второе начало термодинамики.

Энтропия всякой изолированной системы стремится к максимуму ($\Delta S = \max$), т. е. с увеличением энтропии уменьшается свободная энергия и тем самым возрастает устойчивость системы.

Законы термодинамики и кинетики химических реакций дают возможность обобщить изменения энергии в каталитическом процессе с изменением скорости реакций.

Аррениус установил, что химическое взаимодействие возможно только между активными молекулами, т. е. такими, которые обладают запасом энергии, не меньшим, чем необходимо для данной реакции.

Активация молекул достигается повышением температуры, поглощением лучистой энергии, воздействием электрического поля с определенной длиной волны, радиацией, каталитическим воздействием.

В любом процессе между активными и неактивными молекулами существует подвижное химическое равновесие.

Из уравнения Аррениуса

$$N_а = N_о e^{-A/RT},$$

где $N_а$ — число активных молекул;
$N_о$ — общее число молекул;
e — основание натуральных логарифмов;
A — энергия активации, *кал/моль*;
R — универсальная газовая постоянная;
T — абсолютная температура, °К,

вытекает, что скорость реакции увеличивается при уменьшении энергии активации.

Объяснение явления активации представлено на рис. 9.

Реакция $AB+CD=AC+BD$ пойдет самопроизвольно, когда энергия E_0 молекул $AB+CD$ превысит энергию системы E после реакции. Разность $E_0-E_1=q$ — является энергией, выделяющейся при данной реакции, т. е. самопроизвольно проходят реакции, сопровождающиеся уменьшением энергии системы.

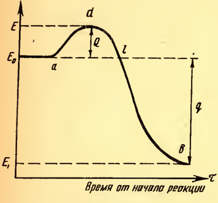


Рис. 9. Схема, объясняющая причину активации молекул.

Следует отметить, что для образования молекул AC и BD из AB и CD требуется разрушение химической связи между $A-B$ и $C-D$.

Начало сближения молекул представлено точкой a, а начальная энергия E_0. Перегруппировка в $AC+$ $+BD$ представлена точкой b.

Для разрушения химической связи требуется дополнительная энергия Q, представляющая собой энергию активации (высота энергетического барьера adl). Без затраты энергии активация не произойдет, однако эта затрата компенсируется с избытком, так как соединение атомов в молекулу сопровождается выделением энергии.

Приведем изменения свободной энергии на разных стадиях ферментативной реакции (рис. 10) (по Lumry).

В ферментативном процессе легче всего протекает стадия присоединения субстрата к ферменту (I), так как скорость ее зависит главным образом от диффузии молекул субстрата к активному участку фермента.

Далее следует стадия преобразования фермент-субстратного комплекса в комплекс фермента с продуктами реакции (II), а затем отделение продуктов реакции от фермента, которое может протекать в несколько стадий (III, IV).

Как видно из графика, ферментативный процесс проходит через активированные комплексы, значительно снижающие общую энергию активации.

Таким образом, образование активного комплекса, требующего определенной энергии активации, которое сопровождается изменением энтропии, может быть математически представлено следующим уравнением

$$\Delta F=\Delta H-T\Delta S,$$

где ΔF — изменение свободной энергии;

ΔH — энергия активации;

ΔS — изменение энтропии.

Приведем некоторые термодинамические константы различных белков (табл. 1).

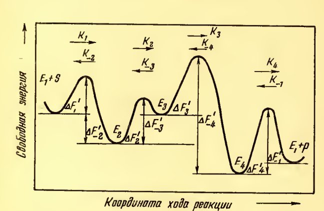


Рис. 10. Измеиеиие свободной эиергии по стадиям ферметативиой реакции.

Таблица 1

Белок	ΔH, кал/моль	ΔS, кал/моль
Протеиназа (панкреатическая)	37 900	40,6
Липаза	45 400	68,2
Амилаза	41 600	52,3
Пепсин	55 600	113,3
Трипсин	40 200	47,7
Дрожжевая инвертаза		
pH 5,7	52 400	84,7
pH 4,0	110 400	262,5
pH 3	74 400	152,4

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРОЦЕССА

В 1913 г. Михаэлис и Ментен вывели уравнения константы скорости ферментативной реакции.

Так как уравнение Михаэлиса — Ментена имеет большое значение для ферментативного процесса и объясняет ряд явлений биологического катализа, считаем целесообразным привести основной математический вывод данного уравнения.

При взаимодействии фермента (F) с субстратом (S) обра-

зуется промежуточный активный комплекс (FS). Скорость образования этого комплекса

$$v_1 = K_1(FS).$$

При равновесии молярная концентрация фермента станет равной $[(F)-(FS)]$, а молярная концентрация субстрата $(S-FS)$. Но так как концентрация субстрата значительно больше концентрации промежуточного комплекса, то можно принять $(S-FS)=S$. Тогда $[(F-FS)+(S)]=FS$. Следовательно, константа равновесия

$$K_1 = \frac{(FS)}{(F-FS)\ (S)}.$$

Из данного уравнения следует, что скорость реакции зависит от скорости распада комплекса FS.

Выполним некоторые преобразования уравнения

$$K_1S = \frac{(FS)}{[(F)-FS]}.$$

Числитель и знаменатель разделим на (FS)

$$K_1S = \frac{1}{\frac{(F)}{(FS)}-1}, \text{ или } K_1S\left[\frac{(F)}{(FS)}\right]-K_1S = 1,$$

или

$$K_1\left[\frac{(S)(F)}{(FS)}\right]=K_1S+1,$$

откуда

$$(FS) = \frac{(S)\ (F)\ K_1}{K_1S+1}.$$

Разделив числитель и знаменатель дроби на K_1, получим

$$(FS) = \frac{(S)\ (F)}{\frac{1}{K_1}+S}.$$

Так как скорость образования фермент-субстратного комплекса определяется скоростью его распада

$$v_2 = K_2(FS),$$

то из предыдущего уравнения

$$v_2 = K_2\frac{(S)\ (F)}{\frac{1}{K_1}+S}.$$

Если фермент полностью входит во взаимодействие с субстратом, т. е. при условии большой концентрации субстрата $(F) = (FS)$ и, следовательно, максимальная скорость

$$v_{\max} = K_2(FS) = K_2(F)$$

тогда

$$v_2 = \frac{v_{\max}(S)}{\frac{1}{K} + S}.$$

Величина $\frac{1}{K}$ обозначается K_{m} и является константой Михаэлиса. Следовательно, последнее уравнение может быть записано в виде

$$v = \frac{v_{\max}(S)}{K_m + S}.$$

Это уравнение является основным уравнением Михаэлиса — Ментена.

При $K_{\text{m}} = (S)$ имеем $v = \frac{v_{\max}}{2}$, т. е. константа Михаэлиса K_{m} (*моль/л*) — есть величина, показывающая значение концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимального значения.

$K_{\text{m}} = \frac{1}{K}$ справедливо при условии, когда константа скорости распада комплекса FS на фермент и субстрат значительно превышает расход ферментного комплекса на фермент и продукты ферментативной реакции (ΣS_{p}), т. е.

$$K_0' \gg K_2; \; F + S \underset{K_0}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} FS \overset{K_2}{\rightarrow} F + \Sigma S_{\text{p}}.$$

Если $(S) \ll \frac{K_2}{K_1}$, то в этом случае скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации субстрата, а при $S \gg \frac{K_2}{K_1}$ реакция будет нулевого порядка, т. е. скорость ее не будет зависеть от концентрации субстрата.

Уравнение Михаэлиса совпадает с уравнением изотермы адсорбции Лангмюра. Лангмюр исходил из предположения, что при адсорбции вещества из раствора на поверхности твердого тела образуется мономолекулярный слой, экранирующий силовое поле адсорбента, и что процесс адсорбции сопровождается одновременно как прилипанием, так и отрывом сорбируемых молекул.

Приведем вывод уравнения Лангмюра. Если принять общую поверхность адсорбента за единицу, а поверхность, занятую сорбируемым веществом, обозначить σ, то свободная поверхность будет представлять собой разность $1 - \sigma$.

Скорость прилипания пропорциональна свободной поверхности, т. е.

$$v_1 = K_1\mu(1-\sigma),$$

где μ — число молекул.

Скорость отрыва молекул пропорциональна занятой поверхности, т. е.

$$v_2 = K_2\sigma.$$

При равновесии $v_1 = v_2$, т. е.

$$K_1\mu\,(1-\sigma) = K_2\sigma.$$

Преобразуя данное уравнение, получим

$$K_1\mu = \sigma\,(K_2 + K_1\mu),$$

откуда

$$\sigma = \frac{K_1\mu}{K_2 + K_1\mu}.$$

Обозначив $\frac{K_1}{K_2}$ через K_0, получим

$$\sigma = \frac{K_0\mu}{1 + K_0\mu}.$$

Приведенное уравнение можно преобразовать для экспериментального определения. Обозначим число грамм-молекул, сорбированных на 1 $см^2$, буквой $Г$, тогда $ГN$ равно числу молекул, адсорбированных 1 $см^2$ (N — число Авогадро).

Значение $ГN$ должно быть равно произведению занятой поверхности (σ) на число пространств, способных сорбировать вещество (N_0), т. е.

$$ГN = N_0\sigma,$$

откуда

$$Г = \frac{N_0\sigma}{N} = \frac{N_0}{N} \cdot \frac{K_0\mu}{1 + K_0\mu}.$$

Отношение $\frac{N_0}{N}$ выражает предельную адсорбцию $Г_\infty$.

Так как $\mu = KC$, то уравнение примет вид

$$Г = Г_\infty \frac{KC}{1 + KC}$$ — уравнение Лангмюра.

Из уравнения Лангмюра вытекает, что при малых значениях C величина адсорбции пропорциональна концентрации, а при больших значениях C адсорбция стремится к предельному значению Γ_∞.

Уравнения Лангмюра и Михаэлиса — Ментена выведены из условия термодинамического равновесия (равенство скоростей адсорбции и десорбции — уравнения Лангмюра и равенство взаимодействия и диссоциации субстрат-ферментного комплекса — уравнение Михаэлиса — Ментена).

Следует при этом отметить, что адсорбционное равновесие длительно, а ферментативный процесс заканчивается, когда субстрат превратится в продукты реакции.

Нам представляется, что уравнение Лангмюра, а также связь уравнения Лангмюра с уравнением Гиббса, учитывающим изменение поверхностного натяжения и адсорбции от концентрации, позволит объяснить влияние концентрации субстрата и ингибиторов на кинетику ферментативного процесса.

Афанасьев указывает, что в уравнение Михаэлиса следует внести поправку, обусловленную тем, что комплекс (FS) структурно отличается от неактивного адсорбционного промежуточного фермент-субстратного комплекса, и вводит новый коэффициент распада активного комплекса.

Пасынский также видоизменяет уравнение Михаэлиса, что позволяет ему, как и Афанасьеву, объяснить образование максимума в скорости ферментативной реакции.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Скорость ферментативных реакций падает при температурах, выше оптимальной.

Математическая зависимость константы скорости от температуры выражается изохорой Вант Гоффа.

$$\frac{d \ln K}{dT} = -\frac{E}{RT^2},$$

где E — энергия активации;
R — универсальная газовая постоянная;
K — константа скорости реакции.

Это уравнение позволяет вычислить энергию активации и значение констант скоростей, определенных при различных температурах.

Интегрируя уравнение Аррениуса, получим

$$\ln K_1 - \ln K_2 = \frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)$$

или

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = \frac{E}{R}\left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}\right).$$

Если разность температур равна 10 *град* и обычные температуры близки к 300° К, то, вводя десятичный логарифм и значение R в калориях (1,986), получим

$$\lg\left(\frac{K_1}{K_2}\right) = \frac{E \cdot 10}{T_1T_2 \cdot 1,986 \cdot 2,3} = \frac{2,18E}{T_1T_2}.$$

Для реакций, скорость которых изменяется в 2—3 раза, энергия активации равняется приблизительно 10—20 *ккал/(г·моль)*, что обычно и находят в биологических системах.

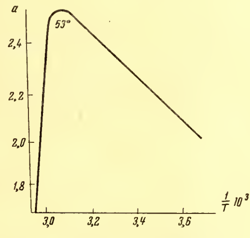


Рис. 11. Влияние температуры на ферментативную активность каталазы.

Коэффициент, определяющий различие в константах скорости при изменении температуры на 10 *град*, принято обозначать Q_{10}:

$$Q_{10} = \frac{K_{т} + 10}{K_{т}}$$ лежит в пределах 2—3.

При повышении температуры реакции наряду с усилением активности фермента происходит и его разрушение. Поэтому оптимальной температурой реакции следует считать ту, при которой повышение скорости ферментативной реакции совпадает с усилением разрушения ферментов. Следовательно, при температуре выше оптимальной происходит ускорение денатурации активного белка. Измерение скорости ферментативного процесса в широком интервале температур показывает, что полученные кривые проходят через максимум (рис. 11).

В кинетике ферментативных процессов предусматривается определение концентрации субстратов и продуктов ферментатив-

ной реакции в *г-молях* на 1 *л*, а продолжительность реакции — в *мин*, т. е. скорость определяется в *Ммин*$^{-1}$.

Следует подчеркнуть, что константы ферментативных реакций могут быть установлены только для индивидуальных ферментов.

Единицей количества фермента считают величину, показывающую превращение 1 *мкмоль* (микромоль) или микроэквивалента химической группы субстрата в 1 *мин* при 25° С и оптимальном значении pH.

Содержание ферментов в ферментных препаратах определяется числом единиц фермента на 1 *мг* или 1 *г* препарата или на 1 *мг* белкового азота. Данная величина называется удельной активностью фермента, являющейся весьма произвольной величиной.

Комиссией по ферментам Международного биохимического союза установлена величина молекулярной активности, показывающая число молекул субстрата, превращаемых в 1 *мин* при 25° С и оптимальном значении pH.

В практике научных исследований и технохимическом контроле производства ферментных препаратов концентрация субстрата определяется произвольным способом, позволяющим оценивать активность ферментов.

Определение активности ферментных препаратов основывается на методах аналитической и физической химии (метод титрования, колориметрия, спектрофотометрический анализ, измерение вязкости, нефелометрия, поляриметрия, рефрактометрия, потенциометрия).

Скорость ферментативной реакции можно определить по скорости распада субстрата или скорости образования продуктов реакции.

Отметим, что активность ферментов необходимо определять при постоянной температуре и оптимальном значении pH. Следует указать, что состав буферного раствора может влиять на определение активности ферментного препарата. Вследствие этого следует для любого из принятых методов определения активности ферментов применять одинаковый состав буфера.

Изменение свободной энергии при ферментативной реакции ΔF можно представить как избыток свободной энергии одного грамм-моля комплекса по сравнению с суммой мольных свободных энергий фермента и субстрата, взятых при тех же концентрациях,

$$\Delta F = -RT \ln K.$$

Приведем значения константы Михаэлиса и изменение свободной энергии фермент-субстратных комплексов при 298,16° К.

Фермент	Субстрат	K, г-моль/л	ΔF, кал/г-моль
Мальтаза	Мальтоза	$2,1\cdot10^{-1}$	900
Мальтаза	α-Метилглюкозид	$5,6\cdot10^{-2}$	1700
Сахараза	Сахароза	$2,8\cdot10^{-2}$	2100
Сахараза	Раффиноза	$4,5\cdot10^{-1}$	500
Зимаза	Глюкоза	$6,0\cdot10^{-3}$	3000
Уреаза	Мочевина	$2,5\cdot10^{-2}$	2200

Чрезвычайно большая скорость ферментативной реакции является результатом как изменения теплоты активации ΔH, так и значения энтропии активации и энтропии при образовании активного комплекса. Изменение энтропии ΔS различных комплексов может иметь положительное или отрицательное значение, что может указывать на образование рыхлого (ΔS растет) или уплотненного комплекса (ΔS уменьшается).

Значение ΔS обусловлено также изменением в сольватации в результате образования фермент-субстратного комплекса.

Сольватация вызывает рост ΔS, а десольватация — уменьшение ΔS.

ВЛИЯНИЕ pH НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Ферментативная активность зависит от степени диссоциации ионогенных групп, которая изменяется с изменением pH среды, что приводит к различному количественному взаимодействию субстрата с ферментом.

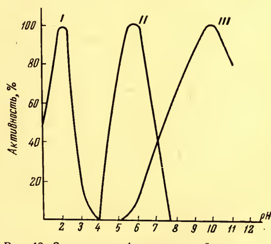


Рис. 12. Зависимость ферментативной активности от pH:

I — пепсин, *II* — карбоксилаза, *III* — аргиназа.

Многочисленными исследованиями установлено наличие максимума зависимости ферментативной активности от pH.

Оптимальное значение pH (максимум на кривой зависимости скорости ферментативной реакции от pH) определяется путем изучения скорости ферментативной реакции при различных значениях pH, при условии, что концентрация субстрата обеспечивает полное насыщение фермента, т. е. когда фермент находится в форме комплекса.

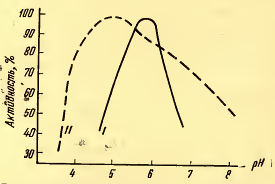


Рис. 13. Зависимость активности α- и β-амилазы от pH:
I — α-амилаза, II — β-амилаза.

Зависимость ферментативной активности некоторых ферментов от pH иллюстрируется кривыми, показанными на рис. 12 и 13.

Из рассмотрения рис. 13 следует ,что β-амилаза более устойчива при больших концентрациях водородных ионов.

Следует отметить также влияние pH на стабильность ферментов и на возможность необратимого инактивирования по одну или по обеим сторонам от оптимума pH, что устанавливается путем инкубирования фермента в растворах, имеющих различное значение pH с последующим определением активности при исходном стандартном pH.

Сопоставление кривых влияния pH на активность ферментов, находящихся в среде с различным pH, а также при различном pH субстрата укажет на стабильность фермента, оптимум его действия и на возможность подавления активности отдельных ферментов при определенном значении pH.

Таким образом, можно определить влияние pH непосредственно на активность свободного фермента, на фермент-субстратный комплекс или на субстрат. Влияние pH обусловлено различием в ионизации групп, находящихся как непосредственно в активном центре, так и вблизи его.

Е. А. Двадцатова и С. Н. Бутова показали, что препараты

ферментов, выделенные из культуральной жидкости, предварительно подкисленной до pH 3,2, обладали высокой способностью гидролизовать декстрины и слабой активностью α-амилазы.

ОСНОВЫ ФИЗИКО-ХИМИИ БИОПОЛИМЕРОВ

Полимерные соединения, как известно, являются веществами, образованными из больших молекул. Молекулярный вес их может достигать многих сотен тысяч единиц.

Макромолекулы полимеров представляют собой гигантские, тонкие и гибкие цепи молекул, что обусловливает высокую прочность и упругость материала.

Синтетические полимеры образуются путем полимеризации и поликонденсации.

Цепные молекулы полимера могут быть построены из одинаковых или различных звеньев (химических групп). Чередование звеньев в цепи может быть как регулярным, так и нерегулярным.

Макромолекулы могут обладать как линейной, так и разветвленной структурой, образующей пространственную сетку.

Рентгеноструктурный анализ высокомолекулярных соединений показывает, что большинство полимеров обычно находится в аморфном состоянии, но некоторые из них обладают определенной упорядоченностью некоторых участков макромолекул, так как обладают элементами кристалличности.

Гибкость молекул, как указывает Каргин, приводит к определенной степени независимости движения отдельных частей молекулы, но не уничтожает взаимосвязанности всех звеньев в общую цепь — молекулу.

Гибкость молекул полимерного соединения обусловливается также взаимодействием соседних групп атомов, находящихся в разных участках цепочечной молекулы, и зависит от длины участка цепи полимерной молекулы.

В химии полимеров введено понятие сегмента, являющегося величиной, эквивалентной молекулярному весу, найденному на основе закона Вант Гоффа (по осмотическому давлению), или закона Рауля (по понижению упругости пара).

При определении вязкости растворов высокомолекулярных соединений предполагается, что растворенные молекулы ведут себя как твердые частицы, обладающие любой формой (эллипсоиды, шары, стержни и др.).

Молекулы белков, обладая ионными и полярными группами, присоединяют одну или несколько молекул полярного растворителя (сольватация).

Помимо сольватации, некоторая часть растворителя в результате гидродинамического эффекта входит в макромолекулу (им-

мобилизуется) не за счет ван-дер-ваальсовых сил. Следовательно, такой растворитель будет передвигаться со скоростью продвижения молекулы полимера. Эту сольватацию необходимо учитывать при определении массы и величины гидродинамической частицы.

На основе гидродинамических свойств установлено, что частицы полимеров должны обладать эллипсоидной формой.

Гидродинамическая величина определяется из измерения вязкости разбавленных растворов

$$[\eta] = \frac{1}{C}\left(\frac{\eta'}{\eta_0} - 1\right)_{C \to 0},$$

где $[\eta]$ — характеристическая вязкость;
η' — вязкость раствора;
η_0 — вязкость растворителя;
C — концентрация (в *г/100 мл*),

Для шарообразных частиц вязкость раствора подчиняется уравнению Эйнштейна

$$\eta' = \eta_0 (1 + 2{,}5\varphi),$$

где φ — отношение объема всех частиц дисперсной фазы к общему объему системы.

Для эллипсоидных частиц вращения Симха предложил уравнение

$$\eta' = \eta (1 + \gamma\varphi),$$

где γ больше 2,5. Следует указать, что приведенные уравнения справедливы для малых скоростей потока и при бесконечном разбавлении раствора.

Оценивая гидратацию белковых молекул, следует указать на большую сложность их электрохимических свойств.

При большом разведении и малой ионной силе ($\mu \ll 0{,}01$) электрофоретическая подвижность (U) зависит от радиуса и заряда (ε) белковой молекулы:

$$U = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta r}.$$

В концентрированных растворах (ионная сила $\mu \gg 0{,}01$) электрофоретическая подвижность молекул белка не зависит от их молекулярного веса.

Следовательно, электростатическое взаимодействие между частицами может быть изменено путем изменения ионной силы раствора.

Таким образом, фракционирование с помощью электрофореза отличается от фракционирования в ультрацентрифуге, так как изменение pH может вызвать деформацию молекулы, например увеличение отношения $\frac{a}{b}$.

Найденные молекулярно-кинетическими методами значения молекулярного веса полимера показывают всегда значительно заниженные результаты, т. е. растворы полимеров резко отклоняются от свойств идеальных растворов.

Следовательно, на основе термодинамических свойств растворов определяется кажущийся молекулярный вес полимеров, т. е. так называемый молекулярный вес сегмента.

К биополимерам относятся природные высокомолекулярные соединения: белки, нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды.

В белковых молекулах принято различать несколько уровней структуры.

Первичная структура — соединение остатков аминокислот в определенной последовательности без возникновения пространственного препятствия, т. е. последовательность аминокислот в цепях.

Вторичная структура — пространственное образование полипептидных цепей, возникающее за счет водородных связей между имидными и карбоксильными остатками сближенных пептидных связей.

Большинство ферментов относится к глобулярным белкам, которые обладают вторичной и так называемой третичной структурой.

Третичная структура белковой молекулы представляет собой трехмерные образования между полипептидными цепями. Спирали винтовой структуры белковой молекулы определенным образом изогнуты и упакованы в относительно жесткие конформации. Устойчивость конформации третичной, а также четвертичной структуры обусловлена большим числом водородных, дисульфидных, ван-дер-ваальсовых и ионных связей.

Упаковка спиралей в эллипсоид, характерная для глобулярных белков, сводит к минимуму свободную энергию.

Структура активного центра фермента представляет собой часть третичной структуры. Уменьшение активности ферментов связано с разрушением значительной части водородных связей, что приводит к разрушению вторичной и третичной структуры. Если удается возвратить белок в первоначальную трехмерную структуру, то ферменту возвращается каталитическая активность.

Функциональные группы фермента (карбоксильные группы, аспарагиновой и глютаминовой кислот, аминогруппы лизина, гуанидиновые группы аргинина, дисульфидные группы цистеина, неполярные белковые цепи) находятся в различных местах цепей белковой молекулы, образующей третичную и нередко четвертичные структуры, которые весьма гибки и изменяются при взаимодействии фермента с молекулами субстратов.

Высшим уровнем структуры, или четвертичной структурой,

белков в водном растворе называется упорядоченная структура, состоящая из нескольких или многих однотипных субъединиц, соединенных в трехмерный компактный агрегат силами слабых связей или весьма часто путем образования хелатных комплексов с металлами.

При удалении простетических групп (небелковые компоненты сложных ферментов), например после длительного диализа, ферменты могут терять свою активность.

Г. А. Молодова, используя полярографический анализ белков, показала зависимость каталитической активности α-амилазы Asp. oryzae от содержания в ферменте иона кальция и установила влияние температуры на изменение полярографической волны и ферментативной активности. Начиная с температуры 55 °C происходит заметное изменение конформации молекул α-амилазы, приводящее к инактивированию фермента.



Рис. 14. Трехмерная модель молекулы миоглобина

Легкодиссоциирующие простетические группы сложных ферментов называют коферментами, а их белковый компонент иногда называют апоферментом.

На рис. 14 схематически представлена трехмерная модель молекулы миоглобина.

Комиссия по ферментам, организованная Международным биохимическим союзом, разработала следующую классификацию ферментов.

1. Оксиредуктазы — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.

2. Трансферазы — ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса различных химических групп, например аминотрансферазы, сульфотрансферазы и др.

3. Гидролазы — ферменты, катализирующие реакции гидролитического расщепления внутримолекулярных связей, например гидролазы гликозидов, дипептидгидролазы, гидролазы сульфоэфиров и др.

4. Лиазы — ферменты, катализирующие реакции присоединения групп по двойным связям или разрывающие такие группы (альдегидлиазы, гидролиазы).

5. Изомеразы — ферменты, катализирующие реакции изо-

меризации, например перемещающие C — C-связи, взаимопревращающие альдозы и кетозы и др.

6. Лигазы — ферменты, катализирующие реакции соединения двух молекул, например лигазы аминокислот — РНК, образуют C—O, C—C, C—N-связи и др.).

* *
*

Таким образом, взаимодействие фермента с субстратом осуществляется не только за счет ковалентных и координационных связей, но и за счет водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных неполярных участков молекул.

Строгая специфичность действия ферментов обусловливается структурным соответствием между пространственной конфигурацией молекул субстрата с несколькими функциональными группами фермента. Только некоторые из пар функциональных групп ответственны за ферментативный катализ.

Большинство ферментативных процессов является следствием дефицита электронов в гидролизуемой связи.

π-Электроны определяют основные физико-химические свойства фермента и субстрата. В гликозидной связи происходит поляризация только σ-электронов. На изменение электронной структуры субстрата расходуется энергия активации. Основа механизма действия ферментов заключается в оттоке электронного облака внутри молекул субстрата.

Образование активного комплекса требует определенной энергии активации. Структура активного центра фермента представляет собой часть третичной структуры.

Функциональные группы фермента находятся в различных местах цепей белковой молекулы, образующей третичную и нередко четвертичную структуры.

Кратко познакомившись в данной главе с основными физико-химическими свойствами ферментов и механизмом их действия, перейдем к рассмотрению теоретических основ производства ферментных препаратов.

Глава II

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ ИЗ КУЛЬТУР ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

В настоящее время культивирование плесневых грибов — продуцентов ферментов проводится поверхностным и глубинным способом.

Прежде чем обосновать процесс извлечения ферментов из культур плесневых грибов, укажем, что в состав ферментов, как и других белков, входит 20 так называемых «магических», или незаменимых, аминокислот, к которым относятся: кислоты с алкильными радикалами — глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин; ароматические аминокислоты — фенилаланин, тирозин; гетероциклические — триптофан; кислые — аспарагиновая и глютаминовая кислоты; содержащие оксигруппы — серин, треонин, серусодержащие аминокислоты — цистин, цистеин, метионин; пирролсодержащие аминокислоты — пролин, оксипролин. В основную группу аминокислот входят лизин, аргинин и гистидин.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

Все указанные аминокислоты содержат NH_2 и СООН группы, находящиеся в α-положении при углеродном атоме.

К редким аминокислотам белков относятся фосфосерин, оксилизин, лантионин и др.

Приведем структурные формулы аминокислот (табл. 2), а также аминокислотный состав и последовательность остатков в активных центрах ферментов (по Коэну).

Фермент	Остатки в активных центрах
Химотрипсин	гли-асп-сер^{P}-гли-про-лей
Трипсин	асп-сер^{P}-цис-глю-гли-асп-сер^{P}-гли
Тромбин	асп-сер^{P}-гли
Фосфоглюкомутаза	асп-сер^{P}-гли-глю-ала-вал
Эластаза	асп-сер^{P}-гли-про-вал
Субтилизин	тре-сер^{P}-мет-ала

Таблица 2

Аминокислота	Структурная формула	Молекулярный вес	Сокращенное обозначение аминокислотного остатка в молекулах белка
1. Глицин	$H-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	75	-гли-
2. Аланин	$CH_3-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	89	-ала-
3. Валин	$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3\searrow}{CH_3\nearrow}C-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	117	-вал-
4. Лейцин	$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3\searrow}{CH_3\nearrow}CH-CH_2-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	131	-лей-
5. Изолейцин	$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3\searrow}{CH_3-CH_2\nearrow}CH-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	131	-илей-
6. Серин	$HO-\underset{H}{\overset{H}{C}}-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	105	-сер-
7. Треонин	$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3\searrow}{HO\nearrow}CH-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow OH}$	119	-тре-

Продолжение табл. 2

Аминокислота	Структурная формула	Молекулярный вес	Сокращенное обозначение аминокислотного остатка в молекулах белка
8. Фенилаланин	$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)OH$	165	-фен-
9. Тирозин	$HO-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)OH$	181	-тир-
10. Триптофан	$C_8H_6N-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)OH$	204	-три-
11. Цистеин	$HS-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)OH$	121	SH | -цис-
12. Цистин	$HO(O=)C-CH(NH_2)-CH_2-S-S-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)OH$	240	-цис- | S | S | -цис-
13. Метионин	$CH_3-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-C(=O)OH$	135	-мет-

Аминокислота	Структурная формула	Молекулярный вес	Сокращенное обозначение аминокислотного остатка в молекулах белка
14. Аспарагиновая кислота	$HO-C(=O)-CH_2-C(H)(NH_2)-C(=O)-OH$	133	-асп-
15. Глютаминовая кислота	$HO-C(=O)-CH_2-CH_2-C(H)(NH_2)-C(=O)-OH$	163	-глю-
16. Лизин	$CH_2(NH_2)-CH_2-CH_2-CH_2-C(H)(NH_2)-C(=O)-OH$	146	-лиз-
17. Аргинин	$H_2N-C(=NH)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-C(H)(NH_2)-C(=O)-OH$	174	-арг-
18. Гистидин	$HN\langle=\rangle N$ (H) $-CH_2-C(H)(NH_2)-C(=O)-OH$	155	-гис-
19. Пролин	H_2 H_2 H O; H_2, N, H — цикл $-C(=O)-OH$	115	-про-
20. Оксипролин	H OH; H_2 H O; H_2, N, H — цикл $-C(=O)-OH$	131	-оксипро-

Напомним определение некоторых производных аммиака.

Моноацилпроизводные аммиака называются амидами, т. е.

$$\begin{array}{c} \mathrm{O}\ \ \mathrm{H} \\ \| \ \ \cdot\cdot \\ \mathrm{R{-}C{:}\ddot{N}{:}H} \end{array}$$

Алкилпроизводные аммиака называются аминами. Первичный амин представляет собой соединение, в котором один из атомов водорода в аммиаке замещен алкилом.

Во вторичном амине два атома водорода в аммиаке замещены алкилами $\mathrm{R:\overset{R}{\ddot{N}}:H}$, в третичном амине — все три атома водорода замещены алкилами $\mathrm{R:\overset{R}{\ddot{N}}:R}$

Четвертичный аммонийный ион аналогичен иону NH_4

$$\left[\begin{array}{c} \mathrm{R} \\ \cdot\cdot \\ \mathrm{R{:}\ddot{N}{:}R} \\ \cdot\cdot \\ \mathrm{R} \end{array}\right]^{+}$$

В белковой молекуле, как известно, диссоциацией обладают COOH- и NH_3-группы. Группа COOH диссоциирует следующим образом: $-COOH \rightleftarrows COO^- + H^+$ и, следовательно, константа диссоциации

$$K_1 = \frac{C_{COO^-} C_{H^+}}{C_{COOH}}.$$

Десятичный логарифм K_1, взятый с обратным знаком, обозначают pK_1, т. е. $-\lg K_1 = pK_1$.

Величина pK служит одной из главных характеристик слабого электролита.

Диссоциация NH_3-группы обусловлена процессом

$$NH_3^+ \rightleftarrows NH_2 + H^+;$$

$$K_2 = \frac{C_{NH_2} C_{H^+}}{C_{NH_3^+}}; \quad -\lg K_2 = pK_2.$$

Свойства бокового радикала

$$\mathrm{R-CH}\begin{array}{l} \diagup \mathrm{COOH} \\ \diagdown \mathrm{NH_2} \end{array}$$

аминокислот или белковой молекулы обусловливают различные значения pK_1 и pK_2.

Величина pK_1 лежит в пределах 3,5—5,5; а pK_2 в интервале 7—9.

При pH<pK аминокислоты заряжены положительно, т. е. аминокислота является катионом, так как диссоциация COOH-групп подавлена.

Если pH>pK_2, аминокислота является анионом, поскольку аминогруппы не заряжены.

При pK_1<pH<pK_2 аминокислота является диполярным ионом (цвиттерионом), так как она заряжена одновременно двумя знаками.

Приведем значения pK_1, pK_2 и pH отдельных алифатических моноаминокислот (табл. 3).

Таблица 3

Аминокислота	pK_1	pK_2	pH_i
Глицин	2,35	9,78	6,1
Аланин	2,34	9,87	6,1
Лейцин	2,36	9,60	6,0
Серин	2,21	9,15	5,7

pH_i означает pH в изоэлектрической точке и является средним значением от величин pK_1 и pK_2, т. е.

$$pH_i = \frac{pK_1 + pK_2}{2}.$$

Приводим количество остатков аминокислот на молекулу химотрипсина по данным Н. Г. Беленького, Л. Б. Полонской и Н. П. Чамина (табл. 4).

Таблица 4

Аминокислота	Количество остатков аминокислот на молекулу	Аминокислота	Количество остатков аминокислот на молекулу
Аланин	22	Метионин	2
Аргинин	4	Пролин	9
Аспарагиновая кислота	22	Серин	27
Валин	23	Треонин	23
Гистидин	2	Тирозин	4
Глицин	23	Триптофан	8
Глютаминовая кислота	14	Фенилаланин	6
Изолейцин	10	Цистин	2
Лейцин	9		
Лизин	13		

Удельный объем белков составляет 0,68—0,75 *см³/г*, а удельный вес соответственно 1,34—1,47 *г/см³*.

АДГЕЗИЯ КУЛЬТУР ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Плесневые грибы относят к аэрофильным микроорганизмам, развивающимся при достаточном количестве кислорода воздуха.

Для оптимального развития гриба и накопления им ферментов требуется определенная температура.

Так, для гриба Asp. oryzae оптимальной температурой является 30—32° С, которая должна поддерживаться в растильной камере.

В процессе развития грибы потребляют значительное количество органических веществ. Установлено (Е. Я. Калашников), что за цикл выращивания гриба теряется 25% сухого вещества питательной среды и при этом выделяется около 825 *ккал* тепла на каждый килограмм воздушносухих отрубей.

В процессе биосинтеза ферментов плесневыми грибами, выращенными поверхностным методом, происходят изменения в соотношении полярных и неполярных участков, что обусловлено взаимодействием аминокислот и неорганических соединений с цепями белковых молекул. Это взаимодействие может происходить как за счет ван-дер-ваальсовых сил, так и водородных, мостичных и гидрофобных связей.

Для некоторых плесневых грибов, например Asp. oryzae, данный процесс сопровождается резким увеличением адгезии к поверхности, на которой происходит культивирование гриба.

Не исключено, что при этом активные центры и функциональные группы ферментов не участвуют в этом и адгезия является следствием изменения физико-химических свойств среды, на которой выращивают плесневые грибы.

Весьма возможно, что помимо взаимодействия аминокислот и неорганических соединений, увеличение адгезии связано также с ферментативным гидролизом углеводов и взаимодействием образующихся продуктов с аминокислотами и белками.

Под адгезией понимают прилипание поверхностных слоев двух разнородных тел, возникающее при их соприкосновении.

Если соприкасаются одинаковые тела, то возникающее прилипание называется когезией (сцеплением).

Адгезия определяется силой отрыва на единицу поверхности соприкосновения.

Хемосорбционное взаимодействие, происходящее на поверхности раздела, является предельным случаем адгезии.

Адгезия высокомолекулярных веществ к металлам обусловливается наличием химически активных групп и увеличивается с увеличением полярности полимера.

Исследованию процесса адгезии посвящены многие работы. Так, С. А. Шрейнер и П. И. Зубов установили, что прочностные свойства клеевых прослоек определяются не только природой

локальных связей между макромолекулами, но и условиями формирования этих прослоек.

В работе А. Я. Королева, П. В. Давыдова и Л. М. Виноградовой показано влияние химической модификации поверхности металла полиалкилгидроксилоксановыми жидкостями.

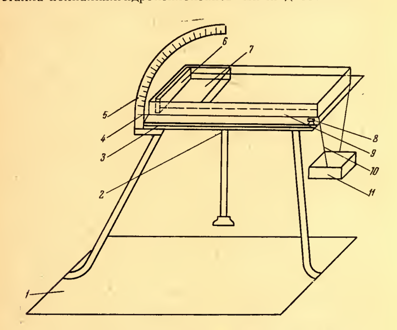


Рис. 15. Прибор для определения адгезии (адгезиометр):
1 — станина, 2 — винт, 3 — площадка, 4 — указатель, 5 — шкала, 6 — пластинка, 7 — рамка, 8 — ось, 9 — площадка, 10 — нить, 11 — площадка.

Гриб Asp. oryzae обладает значительно большей адгезией, чем гриб Asp. awamori. Прилипание к поверхности кюветы влечет за собой потерю выхода ферментного препарата.

С целью определения величины адгезии нами сконструирован прибор, основанный на определении величины угла, при котором происходит начало скольжения сыпучего материала (ксерогелей различной влажности), или силы, необходимой для сдвига геля с испытуемой поверхности (Шульман, Вайнер).

Прибор (рис. 15) состоит из неподвижной станины, на которой укреплены площадка из пластмассы и шкала, градуированная в угловых градусах. На оси крепится металлическая площадка с бортиками, имеющая указатель. В центре неподвижной пластины вращается винт с рукояткой, позволяющий плавно изменять угол подъема площадки.

При определении адгезии сыпучих веществ отмечают угол

наклона верхней площадки, при котором происходит начало скольжения испытуемого материала.

При большой адгезионной силе данный метод не позволяет определить величину адгезии, так как скольжения испытуемого материала не наблюдается даже при наклоне площадки под углом 90°.

При определении адгезии гелей или других веществ, обладающих большой адгезией к соприкасающейся поверхности, величина адгезии определяется силой отрыва поверхности материала от исследуемой поверхности. Определение проводится следующим образом.

На площадку, где происходит процесс образования геля или насыпается исследуемый материал, вставляется пластмассовая рамка, ограничивающая (срезающая) определенную поверхность испытуемого материала. Остальная часть геля или другого вещества, не вошедшего в поверхность ограничительной рамки, удаляется с площадки.

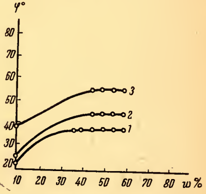


Рис. 16. Зависимость угла сдвига φ отрубей от их влажности:
1 — покрытие фторопластом, *2* — покрытие лаком ГКЖ-94, *3* — без покрытия.

Затем к краю исследуемого материала устанавливается пластмассовая пластинка *9* с закрепленными на концах прочными нитями, к которым подвешена площадка *11* для установки разновесов.

Величина адгезии определяется силой P (весом гирь), вызывающей начало скольжения исследуемого материала, отнесенной к размеру поверхности S, т. е. $A=\frac{P}{S}$.

Были проведены определения угла сдвига скольжения и силы отрыва различных компонентов питательной среды. Исследовались отруби, солодовые ростки, кукурузная мука, картофельная мезга, свекловичный жом, жом Asp. oryzae.

Результаты определения представлены на рис. 16.

Как видно из приведенных данных, с увеличением влажности сырья начало скольжения (угол φ) увеличивается. После 45%-ной влажности изменение угла наклона не влияет на сдвиг (скольжение) исследуемых материалов.

Таким образом, после достижения определенной влажности сырья дальнейшее увлажнение его не сказывается на адгезии материала.

Известно, что прилипание можно уменьшить за счет различ-

ных покрытий, наносимых на металлические поверхности. К таким покрытиям относятся кремнийорганические соединения, например лаки ГКЖ-94, ГКЖ-11; ГКЖ-10, К-54, фторопласт-4 (пленки и пластинки).

После покрытия кюветы пленкой фторопласта или кремнийорганическим лаком ГКЖ-94 проводились определения угла начала скольжения, высыпания и силы отрыва вышеуказанных компонентов.

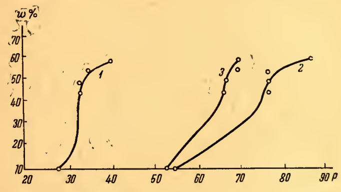


Рис. 17. Влияние влажности отрубей на силу их отрыва:
1 — покрытие фторопластом, *2* — без покрытия, *3* — покрытие лаком ГКЖ-94.

Установлено, что покрытие поверхности кюветы фторопластом заметно снижает величину угла сдвига и силу отрыва, т. е. тем самым способствует снижению адгезии (рис. 17).

Применение в качестве покрытий растительного и минерального масла, кремнийорганического лака ГКЖ-94 заметных изменений не дало.

Покрытие кюветы растительным маслом способствует увеличению прилипания.

В дальнейшем выращивание гриба проводилось на кюветах с антиадгезионными покрытиями. Кроме того, в среду добавляли неполярные или малополярные вещества.

При выращивании гриба Asp. oryzae на кюветах с различным покрытием лучшие результаты были получены при применении фторопластовой пленки или пластины. Активность культуры гриба при этом не уменьшается, а сила отрыва гриба от кюветы уменьшается с 500 до 100 *г*, т. е. в 5 раз.

Добавление в питательную среду 1% растительного или минерального масла или силикона ГКЖ-94 также не способствовало уменьшению силы отрыва.

При добавлении минерального масла в питательную среду культура гриба становится более сыпучей, т. е. тем самым уменьшается когезия между ее частицами.

Проведенные исследования позволили установить зависимость отрыва культуры гриба от вида покрытия поверхности кюветы (табл. 5).

Таблица 5

Культура гриба	Покрытие	Активность АС, *ед/г* сухих веществ	Сила отрыва *P*, *г*	*P/S*, *г/см²*	Примечание
Asp. oryzae КС	Контроль (без покрытия)	23	>500	—	Отрыва не было
	Фторопласт (пленка)	24,6	115	2,34	
	Растительное масло	24,6	250	5,10	
	ГКЖ-94	29,8	250	5,10	
	ГКЖ-11	30	500	—	Отрыва не было
	Фторопласт (пластина)	22	100	2,04	
Asp. awamori	Контроль (без покрытия)	—	500	12,04	
	Растительное масло	—	250	5,10	
	ГКЖ-94	—	350	7,14	
	Фторопласт (пленка)	—	75	1,53	
	Фторопласт (пластина)	—	50	1,02	

Влияние некоторых добавок на адгезию культуры гриба иллюстрируется данными табл. 6.

Таблица 6

Добавки к питательной среде	Активность АС, *ед/г* сухих веществ	Сила отрыва *P*, *г*	*P/S*, *г/см²*	Покрытие
Контроль (без добавок)	19,6	450	9,18	Без покрытия
1% растительного масла	20	400	8,16	» »
То же	17	250	5,10	Растительное масло
10% крахмала в отрубях	—	>500	—	Без покрытия
20% крахмала	—	>500	—	» »
15% крахмала	—	150	3,06	Фторопласт (пленка)
15% крахмала	—	100	2,04	Фторопласт (пластина)
1 *мл* минерального масла	20	500	12,04	Без покрытия
1 *мл* силикона ГКЖ-94	22,2	290	5,9	» »

Следовательно, покрытие поверхности кювет фторопластом способствует заметному уменьшению адгезии культуры гриба, в то время как силиконовые лаки дают значительно меньший эффект.

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Получение ферментного раствора в процессе извлечения ферментов при поверхностном или глубинном культивировании микроорганизмов обусловлено закономерностями диффузионных явлений, на общих принципах которых мы вначале и остановимся.

Диффузия представляет собой процесс перехода молекул из области с более высокой концентрацией в область низкой концентрации. Вследствие молекулярно-кинетического движения частиц происходит их перемещение до выравнивания концентрации по всему объему.

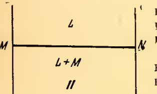


Рис. 18. Схема осмотического давления.

Таким образом, процесс выравнивания концентраций в растворе или давления газа называется диффузией.

Эйнштейн показал, что между осмотическим давлением и диффузией существует определенная связь. Осмотическое давление можно характеризовать как меру стремления молекул растворенного вещества перейти в результате теплового движения из раствора в чистый растворитель и равномерно распределиться в нем.

Для объяснения осмотического давления воспользуемся одним из общих свойств газов и частиц в разбавленных растворах распространяться во всем объеме.

Представим себе сосуд, разделенный полупроницаемой мембраной MN на равные объемы I и II (рис. 18). Предположим, что в объеме I находится газ L , обладающий давлением P, а в объеме II — смесь двух газов L и M, парциальное давление которых соответственно равно P_L и P_M. Вначале давление газа равно сумме парциальных давлений газов L и M, т. е. $P_0=P_L+$ $+P_M$.

Если предположить, что мембрана проницаема для газа L и непроницаема для газа M, то газ L из объема I перейдет в объем II (так как парциальное давление газа L в объеме II меньше давления в объеме I) и парциальное давление его станет равным парциальному давлению газа L во второй части сосуда.

Следовательно, общее давление будет больше первоначального.

Газ L, обладающий большей концентрацией, чем газ M, мы можем рассматривать как дисперсионную среду (растворитель), а газ M — как дисперсную фазу и объяснить проникновение растворителя (при наличии полупроницаемой мембраны) молекулярно-кинетической теорией.

Осмотическое давление в разбавленных растворах пропорционально концентрации и их абсолютной температуре:

$$PV = nRT.$$

Если заменить n (число грамм-молекул растворенного вещества в данном объеме) значением $n=\frac{G}{M}$ (где G — вес в граммах, а M — молекулярный вес), получим

$$P = \frac{G}{M} RT,$$

откуда

$$M = RT\frac{G}{P}.$$

Измерение осмотического давления растворов является одним из методов определения молекулярных весов высокополимеров.

Предположим, что перегородка MN будет снята, тогда начнется процесс диффузии вещества M в растворитель L.

Концентрация вещества M на высоте h будет больше, чем на высоте $h+dh$.

Предположим, что площадь сечения цилиндра $S=1$, следовательно, объем между h и $h+dh$ будет равен dh.

На высоте h действует давление p (на нижнее основание), а на высоте $h+dh$, т. е. на верхнее основание, $p—dp$, где dp — разность осмотического давления на высоте h и $h+dh$.

На объем dh действует давление $(p-dp)-p=-dp$.

На единицу объема действует сила $F=-\frac{dp}{dh}$.

Так как $P=CRT$, или $dp=RTdC$, то $F=-RT\frac{dC}{dh}$.

Чтобы найти силу f, действующую на одну молекулу, мы должны разделить F на молекулярную концентрацию, т. е.

$$f = \frac{F}{NC} = -\frac{RT}{NC}\cdot\frac{dC}{dh}.$$

Когда сопротивление станет равным движущей силе, то, по Стоксу, $f=6\pi\eta rv$, где η — коэффициент вязкости среды; r — радиус частицы и v — скорость ее движения.

Из последнего уравнения $v=\frac{f}{6\pi\eta r}$.

Умножив обе части уравнения на C, получим уравнение Эйнштейна:

$$VC = \frac{RT}{N}\cdot\frac{1}{6\pi\eta r}\cdot\frac{dC}{dh},$$

в котором VC выражает количество вещества, прошедшего за единицу времени через единицу площади. Оно пропорционально изменению концентрации на единицу расстояния $\frac{dC}{dh}$.

Коэффициент пропорциональности, стоящий перед $\frac{dC}{dh}$, представляет собой коэффициент диффузии D:

$$D = \frac{RT}{N \cdot 6\pi\eta r}.$$

Если в качестве растворителя взята вода и диффузию измеряли при 18° С, то $D = 1{,}58 \cdot \frac{1}{r} \cdot 10^{-8}$.

Эйлер дает следующую эмпирическую формулу, связывающую коэффициент диффузии с молекулярным весом

$$D = \sqrt{M} = 5{,}4.$$

В 1855 г. Фик вывел уравнение, позволяющее определять перенос вещества в процессе диффузии, т. е. связать этот перенос с изменением концентрации в пространстве:

$$\frac{dm}{d\tau} = DS\left(\frac{dC}{dh}\right),$$

где $\frac{dm}{d\tau}$ — скорость прохождения вещества через площадь S;

D — коэффициент диффузии.

Из уравнения Эйнштейна следует, что вязкость $\eta = \frac{KT}{6\pi r} \cdot \frac{1}{D}$, т. е. текучесть является, по определению Гликмана, «вынужденной» диффузией молекул в одном направлении.

М. С. Шульман и А. Л. Карильштадт показали, что коэффициент диффузии электролитов зависит от концентрации студня (D KCl в 3%-ный студень агара равен 0,285, а в 5%-ный студень агара — 0,235) и от валентности катиона электролитов, что полностью согласуется с работами А. В. Думанского и данными Фридмана и Кремера, изучавших диффузию различных органических соединений (глицерина, лактозы, мочевины и др.) в студни желатина и показавших, что коэффициент диффузии уменьшается с повышением концентрации геля.

Низкоагрегированная фракция увеличивает коэффициент диффузии электролита в студень, так как, адсорбируясь поверхностью высокоагрегированных молекул, она вызывает пептизирующее действие и тем самым ослабляет аттракцию между молекулами высокомолекулярной фракции.

Внутри клетки на молекулярном расстоянии диффузия протекает весьма быстро (миллисекунды).

Клеточные мембраны способствуют значительному уменьшению скорости диффузии.

Особенностью диффузии через мембраны является резкий скачок концентрации.

При наличии мембран правильнее говорить о проницаемости, так как большинство мембран проницаемо только для определенных веществ. Если концентрации растворенного вещества по обе стороны мембраны различны, то растворитель переходит в сторону большей концентрации, т. е. при этом возникает осмотическое давление.

Если по обе стороны мембраны концентрации соответственно равны C_1 и C_2, то скорость перемещения через мембрану будет

$$\frac{dm}{d\tau} = K(C_1 - C_2),$$

где K — проницаемость мембраны,

$\frac{dm}{d\tau}$ — скорость прохождения вещества.

Следует отметить, что молекулы белков и нуклеиновых кислот имеют размеры в пределах 10—1000 Å.

Как уже говорилось, извлечение ферментов после культивирования микроорганизмов происходит диффузионным путем.

Диффузия ферментов из культур плесневых грибов, выращенных поверхностным методом

Принцип процесса диффузии ферментов из культур плесневых грибов был заимствован из опыта сахарной промышленности, использующей извлечение сахарозы из свекловичной стружки путем противоточной непрерывной диффузии.

Однако между ними есть и различие, заключающееся в том, что для извлечения сахара из свекловичной стружки необходим разрыв вакуолей клетки с помощью нагревания не менее чем до 60 °C.

Схему противоточной диффузии П. М. Силин представляет следующим образом:

C_1
Жом ← ← Стружка
A ———— $Б$
Вода $C_1 = 0$ → → C_2 Диффузионный сок

Он указывает, что, несмотря на давность применения метода диффузии в сахарной промышленности (более 90 лет), до последнего времени в практике пренебрегали законами диффузии и главное внимание обращали на число диффузоров в ба-

тарее и плотность ее набивки свекловичной стружкой. Полагали также, что необходимо уменьшить так называемое «вредное пространство» путем уменьшения диаметра коммуникаций.

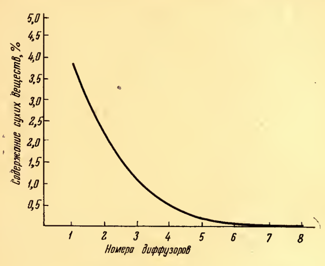


Рис. 19. Изменение содержания сухих веществ при извлечении ферментов.

П. М. Силин считает, что при диффузии сахарозы из свекловичных стружек значение x (путь диффундирования) в уравнении Фика следует считать равным $\frac{d}{4}$, где d — толщина стружки.

Указанная величина получается, если принять, что максимальный диффузионный путь от середины стружки равен $\frac{d}{2}$, а минимальное значение равно 0.

Исходя из сказанного уравнение диффузии примет следующий вид:

$$D = \frac{KT}{\eta} S \frac{C_1 - C_2}{\frac{d}{4}} \tau.$$

Изменение содержания сухих веществ и ферментов в процессе диффузии представлено на рис. 19.

Необходимо отметить, что извлечение ферментов из плесневых грибов происходит раньше, чем других растворимых фракций неактивных полимерных соединений.

Для извлечения ферментов из культур плесневых грибов, выращенных поверхностным методом, требуется 30—45 *мин* (рис. 20).

Заслуживает внимания способ повышения концентрации вытяжки путем последовательного пропускания ее через несколько

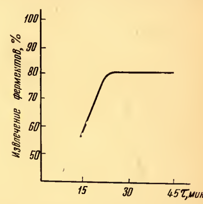


Рис. 20. Влияние продолжительности экстрагирования (диффузии) на извлечение ферментов.

головных диффузоров, заполненных свежей порцией сухой культуры гриба. Этот способ может быть использован при получении ферментов в виде сиропов, так как при диффузии с обогащением концентрация сухих веществ в экстракте достигает 30% и более.

Влияние температуры на диффузию ферментов

С понижением температуры скорость диффузии падает. По данным Эгольма, для сильных электролитов это уменьшение достигает около 2,5% на 1 *град*.

Температурный коэффициент диффузии вычисляется из коэффициентов диффузии, измеренных при двух температурах:

$$\frac{D_2}{D_1} = 1 + \alpha (T_2 - T_1),$$

где D_2 и D_1 — коэффициенты диффузии при T_2 и T_1;
α — температурный коэффициент диффузии.

С повышением температуры на 10 *град* коэффициент диффузии возрастает в 1,28 раза, т. е.

$$\frac{D_{T+10}}{D_T} = 1{,}28.$$

Указанный температурный коэффициент диффузии значительно меньше температурного коэффициента скорости гомогенных реакций, для которых, как известно, температурный коэффициент лежит в пределах от 2 до 4 на 10 *град*.

Повышение температуры для более полного извлечения ферментов при экстракции возможно лишь до определенного предела (рис. 21), иначе это может привести к инактивации ферментов.

По второму закону Фика в диффузионном процессе скорость изменения концентрации пропорциональна изменению градиента концентрации

$$\left(\frac{dC}{d\tau}\right)_x = D\left(\frac{d^2C}{dx^2}\right)_\tau .$$

Это уравнение в интегральном виде используют для определения коэффициента диффузии D, задаваясь предельным условием опыта

$$C = Ae^{-\frac{x^2}{4D\tau}}.$$

Определяя концентрации C_1 и C_2 на расстоянии x_1 и x_2, получаем

$$\frac{C_2}{C_1} = e^{-\frac{x_2^2 - x_1^2}{4D\tau}}.$$

Рис. 21. Влияние температуры на извлечение ферментов из культуры гриба Asp. niger (по данным Л. С. Лосяковой).

Коэффициент диффузии D может иметь размерность *см²/сек*, *м²/сек* или *см²/сутки*.

Ниже приведены значения коэффициентов диффузии D (в *см²/сек*) молекул некоторых веществ, диффундирующих в воду при 20°.

Глицин	$95 \cdot 10^{-7}$
Аргинин	$58 \cdot 10^{-7}$
Цитохром *c*	$10,1 \cdot 10^{-7}$
Пепсин	$9,0 \cdot 10^{-7}$
Карбоксигемоглобин	$6,2 \cdot 10^{-7}$
Уреаза	$3,5 \cdot 10^{-7}$
Вирус табачной мозаики	$0,53 \cdot 10^{-7}$
Сахар	$4,6 \cdot 10^{-6}$
Конго красный	$5,4 \cdot 10^{-6}$
Яичный альбумин	$7,8 \cdot 10^{-7}$
Препарат целлюлозы (в медно-аммиачном растворе)	$2,4 \cdot 10^{-7}$
Полистирол (в бензоле)	$8,3 \cdot 10^{-8}$
Декстрин	$7,6 \cdot 10^{-7}$

Коэффициент диффузии биологически активных веществ часто определяют по скорости проникновения их из раствора в растворитель через пористый диск, который предотвращает конвекционный перенос.

Интенсификация процесса извлечения ферментов из культуры плесневых грибов

Исследования, проведенные во ВНИИФСе, показали, что можно успешно извлекать ферменты из культуры плесневых грибов экстрагированием их не в диффузорах, а в непрерывно действующих механических экстракторах. Этот способ имеет ряд преимуществ по сравнению с экстракцией в диффузорах и должен в ближайшее время заменить его.

Основные закономерности процесса диффузии, изложенные выше, справедливы и для указанного способа экстрагирования ферментов.

Эффективность экстрагирования различных веществ, содержащихся в клетке мицелия, можно повысить растиранием. В связи с этим большой интерес может представить совместное измельчение и экстрагирование материала.

Шульманом и Деминой исследована возможность виброэкстрагирования ферментов культуры плесневых грибов Asp. oryzae на вибромельнице М-10. Культура грибов после высушивания до влажности 12—15% предварительно измельчалась на вальцевой дробилке, а затем в различном соотношении с водой загружалась в вибромельницу, рабочая емкость которой была 6 *л*, а частота колебания 3000 в минуту.

Виброэкстрагирование вели в течение 1, 2, 3, 5 и 10 *мин*. Соотношение сухой культуры гриба и воды при загрузке было 1 : 5; 1 : 6; 1 : 7; 1 : 8.

Так как жом культуры получался довольно влажным (80—82%) и, следовательно, содержал определенное количество ферментов, его подвергали экстрагированию настаиванием в лабораторных условиях двойным по весу количеством воды, получая снова вытяжку и жом.

Это позволяло учесть распределение ферментов между жидкостью и твердой фазой.

Предварительные опыты показали, что для виброэкстрагирования ферментов следует остановиться на соотношении культуры плесневых грибов и воды 1 : 7 и 1 : 8. Экстрагирование амилазы в вибрационной мельнице позволяет повысить выход фермента за 1—2 *мин* до 115—140% по сравнению с одночасовым настаиванием культуры гриба.

Препараты, выделенные осаждением спиртом вытяжки, полученной после виброэкстрагирования, содержат комплекс ферментов в тех же соотношениях, что и препараты, получаемые из диффузионной вытяжки.

Следует указать, что несмотря на значительное разбавление вытяжки, полученной после виброэкстрагирования, потери ферментов с твердым остатком были невелики. Интересно отметить, что активность препарата, полученного из диффузионной вытяж-

ки, была в 1,5 раза ниже активности препарата, полученного после виброэкстрагирования, что также является следствием большого разбавления вытяжки.

Нам представляется, что способ извлечения ферментов из поверхностной культуры плесневых грибов виброэкстрагированием будет также использован в технологии производства ферментных препаратов.

Жом хорошо отделяется от экстракта с помощью фильтр-пресса. Твердая фаза (брикеты) после фильтрования обладает влажностью до 60%.

Дополнительное извлечение ферментов из жома

Жом, получаемый при диффузионном извлечении ферментов, всегда содержит некоторое количество ферментов. Поэтому интересно было выяснить возможность дополнительного извлечения из него ферментов с помощью вибрационной мельницы.

Был проведен следующий опыт. Одну навеску жома поместили в вибромельницу, разведя двойным по весу количеством воды, и подвергли обработке в течение 1, 2, 3 и 5 *мин*, а другую навеску того же жома экстрагировали двумя объемами воды настаиванием в течение 7 *ч* при комнатной температуре.

После 1 *мин* экстрагирования в вибромельнице активность амилазы в экстракте повысилась с 0,2 до 0,6—0,7 *ед/мл*, в то время как при настаивании активность возросла до 0,23 *ед/мл* только через 3 *ч* и через 6 *ч* — до 0,26 *ед/мл*.

Таким образом, настаиванием труднее полностью извлечь амилазу из мицелия гриба, выросшего на поверхности твердого субстрата.

Влияние электролитов на экстракцию ферментов из поверхностной культуры гриба Asp. oryzae

Известно, что некоторые электролиты оказывают стимулирующее действие на процесс извлечения ферментов. Добавление солей применяют также при определении активности ферментов в культурах грибов для создания лучших условий экстракции.

При экстракции ферментов на вибрационной мельнице добавлением электролитов ($NaCl$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$) не удалось уменьшить разведение и получить более концентрированные растворы.

При уменьшенном количестве воды измельченную массу значительно труднее извлечь из мельницы. Было установлено, что хлористый натрий не оказывает никакого влияния на процесс экстракции амилазы, в то время как хлористый кальций при концентрации 2% по весу культуры снижает активность ее в растворе на 30% по сравнению с контролем, а хлористый цинк (0,2%) уменьшает активность амилазы в растворе до 35%. Эти

данные получены при экстрагировании амилазы настаиванием в течение 4 *ч*. При тщательном растирании культуры гриба с песком или стеклом оказалось, что хлористый кальций и хлористый цинк также инактивировали ее, однако при добавлении хлористого натрия процесс экстракции амилазы заметно интенсифицировался в течение первых двух часов (табл. 7).

Таблица 7

Культура гриба	АС (в *ед/мл*) при экстрагировании в течение			
	1 *ч*	2 *ч*	3 *ч*	4 *ч*
Без NaCl (контроль)	8,0	9,0	10,0	10,0
С добавлением NaCl, % по весу культуры				
0,02	9,2	10,0	12	12
0,05	10,9	11	12	12
0,10	10,9	11	12	12
0,20	11,0	12	12	12

Из приведенных данных видно, что добавление NaCl в количестве 0,1—0,2% по весу культуры с одновременным растиранием с песком позволяет одночасовым настаиванием извлекать на 30% больше амилазы по сравнению с контролем. Поэтому добавление хлористого натрия для лучшего извлечения ферментов следует рекомендовать при анализе культур грибов на содержание ферментов.

Таким образом, нами установлено, что экстрагирование с одновременным измельчением культуры гриба в вибрационной мельнице позволяет за 1—2 *мин* полностью извлечь содержащиеся в культуре гриба ферменты, причем выход амилазы при этом превышает выход, полученный при экстракции на диффузионной батарее или по сравнению с расчетными данными на основании анализа культуры гриба.

Обработка жома, полученного после экстракции ферментов на батарее диффузоров, приводит к дополнительному извлечению некоторого количества амилазы, что подтверждает потери ферментов при диффузии.

Экстрагирование ферментов водой или разбавленными растворами солей следует производить при значении pH, удаленном от их изоэлектрической точки.

Интенсификация экстрагирования может быть достигнута также добавлением синтетических детергентов, снижающих поверхностное натяжение на границе раздела фаз, а также путем управляемого автолиза, т. е. воздействием протеолитических

ферментов на нерастворимые (неразрушенные) клеточные мембраны.

Н. Г. Беленький, Л. Б. Полонская и Н. П. Чамин разработали комплексную технологию получения из животного сырья ферментных препаратов, а также гормонов, применяемых в медицине и ветеринарии.

Основным сырьем для получения указанных препаратов является поджелудочная железа крупного рогатого скота, консервируемая путем замораживания при определенном режиме и хранящаяся при температурах ниже —15 °С. Во избежание разрушения биологически активного вещества весьма важно соблюдать оптимальный режим дефростации и измельчения эндокринного сырья.

Гормоны и ферменты экстрагируют слабоподкисленными растворами, что предотвращает или заметно затормаживает автолитические процессы. Следует отметить, что при pH 1,5—2,0 устойчивы дезоксирибонуклеаза, рибонуклеаза, химотрипсин и трипсин.

Карбоксипептидаза, амилаза, эластаза и коллагеназа слабо подвергаются автолитическим процессам, но весьма сильно инактивируются в растворах при pH ниже 3, вследствие чего их следует экстрагировать при pH 5—7.

Д. Б. Лифшиц, М. А. Высоцкая и А. Х. Мальковская показали, что отбросный мицелий лимоннокислотного производства (при поверхностном способе культивирования) содержит активную пектиназу. Ими разработана технологическая схема извлечения мицелия водой с последующим осаждением ферментов изопропиловым спиртом (при 55%-ной концентрации в растворе).

Переход в раствор ферментов при глубинном культивировании

При глубинном способе культивирования переход ферментов в раствор происходит по законам микро- и макродиффузии, т. е. по закону массообмена.

Под массообменом понимают процесс переноса вещества в пределах одной или нескольких фаз.

Диффузионный поток, или интенсивность массопередачи, определяется как количество вещества, передаваемое единице поверхности в единицу времени.

Движущей силой процесса массообмена является разность концентрации, разность температуры, давления и др., т. е.

$$q = K\Delta C,$$

где q — интенсивность массообмена,
K — коэффициент массопередачи, размерность которого определяется характером движущей силы процесса;
ΔC — разность концентрации, давления или температуры.

Массопередача (перенос вещества) может проходить как в результате молекулярной диффузии (по законам микрокинетики), так и вихревой, или турбулентной, диффузии (по законам макрокинетики).

Если процесс культивирования микроорганизмов происходит непрерывно, то коэффициент массопередачи, который зависит от ряда факторов (скорости вращения мешалки, плотности, вязкости и поверхностного натяжения раствора, соотношения диаметра и высоты слоя), при установившихся условиях будет величиной постоянной.

Следовательно, можно полагать, что при установившемся процессе переход ферментов в раствор будет происходить в процессе культивирования, а скорость перехода будет обусловлена диффузией.

Процесс диффузии через мембраны (стенки клеток) можно представить следующим образом.

Наружная часть	Мембрана	Внутренняя часть
D_1	D_2	D_3
C_1	C_2	C_3

При диффузии через мембраны можно рассматривать три области: жидкость по обе стороны мембраны и самое мембрану. Так как мембрана тонка, то вводить понятие о концентрации внутри мембраны (C_2) не имеет смысла. Мембрана характеризуется проницаемостью K, а проходящий через нее поток удовлетворяет уравнению

$$\frac{1}{S} \cdot \frac{dC}{d\tau} = K(C_1 - C_3).$$

Если молекула фермента прошла, например, расстояние x, то указанный в уравнении поток, проходящий через мембрану, равен потоку, входящему в мембрану из жидкости и выходящему в жидкость, что может быть выражено уравнением

$$D_1 \frac{dC_1}{x} = D_3 \frac{dC_3}{x}.$$

Сказанное справедливо при условии отсутствия перемешивания раствора.

Беспорядочное перемешивание способствует увеличению коэффициента диффузии.

Скорость диффузии ферментов из клетки в среду зависит как от молекулярного веса белка, так и от конформации его молекулы, а также от места сосредоточения фермента в клетке (цитоплазма, митохондрии, микросомы и др.).

Каждая клеточная структура обладает сложным микроскопическим строением и отличается структурой клеточных мембран. Вот почему различные ферменты извлекаются из клеток с различной скоростью, а для полного извлечения некоторых из них требуется измельчение (гомогенизация) клеток.

* *
*

При культивировании ферментов плесневых грибов поверхностным методом наблюдается их адгезия к поверхности металлических кювет, что особенно ярко проявляется при культивировании гриба Asp. oryzae. Уменьшение адгезии может быть достигнуто покрытием поверхности кювет фторопластом.

Извлечение ферментов при поверхностном или глубинном культивировании микроорганизмов обусловлено закономерностями диффузионных явлений. Показана возможность интенсификации процесса извлечения ферментов из поверхностных культур плесневых грибов путем виброэкстрагирования, что позволяет также дополнительно извлечь ферменты из жома (после диффузии).

При глубинном способе культивирования переход ферментов в раствор происходит по законам как молекулярной диффузии (по законам микрокинетики), так и в результате вихревой или турбулентной диффузии (по законам макрокинетики).

Глава III

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОЧИСТКИ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Очистка и фракционирование биологически активных веществ основаны на методах, широко применяемых в физикохимии полимеров и химии белковых веществ.

После экстрагирования ферментов из культур плесневых грибов, выращенных поверхностным способом, или после культивирования микроорганизмов глубинным методом раствор ферментов или культуральную жидкость предварительно подвергают очистке.

Очистка некоторых ферментов может происходить и в процессе фракционирования данного комплекса ферментов, так как некоторые примеси могут перейти в водный раствор органической жидкости, применяемой для дробного осаждения ферментов.

Кратко рассмотрим современные методы очистки и фракционирования белков.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Одним из широко применяемых методов фракционирования белков является высаливание нейтральными солями. Впервые этим способом были отделены глобулины от альбуминов. Глобулины осаждаются при 50%-ном насыщении сернокислым аммонием, а альбумины — при более высокой концентрации. Сульфат натрия, обладая меньшей растворимостью, чем сернокислый аммоний, осаждает только глобулины.

Выявлено, что ионы, обладающие одинаковой валентностью, вызывают равный эффект высаливания, а высаливающее действие различных ионов пропорционально квадрату их валентности или величине, называемой ионной силой.

Ионная сила раствора

Ионная сила раствора равна половине суммы общих молярностей каждого иона, находящегося в растворе, умноженной на квадраты валентностей этих ионов. Ионная сила обычно обозначается буквой μ и определяется уравнением

$$\mu = \frac{C_1 z_1^2 + C_2 z_2^2 + \ . \ . \ .}{2},$$

где C — молярная концентрация;
z — валентность иона.

При определении ионной силы раствора суммируются все ионы.

Уравнение ионной силы раствора может быть представлено также следующим выражением:

$$\mu = \frac{1}{2}\sum_{1}^{n} C_i z_i^2,$$

где C_i — концентрация в молях на 1 *л*;
z_i — валентность каждого иона в растворе, содержащем n ионов.

Приведем пример расчета ионной силы 0,1 и 1 *М* раствора хлористого натрия:

$$\mu_{0,1M\,NaCl} = \frac{0,1 \cdot 1^2 + 0,1 \cdot 1^2}{2} = 0,1; \quad \mu_{1M\,NaCl} = \frac{1 \cdot 1^2 + 1 \cdot 1^2}{2} = 1.$$

Таким образом, ионная сила раствора соли с двумя одновалентными ионами (например, раствор хлористого натрия) равна ее молярности, умноженной на коэффициент, равный 1.

Ионная сила двухвалентных ионов:

$$\mu_{0,1M\,MgCl_2} = \frac{0,1 \cdot 2^2 + 0,1 \cdot 1^2 + 0,1 \cdot 1^2}{2} = 0,3;$$

$$\mu_{0,1M\,MgSO_4} = \frac{0,1 \cdot 2^2 + 0,1 \cdot 2^2}{2} = 0,4.$$

Следовательно, для солей, у которых один двухвалентный ион и два одновалентных ($MgCl_2$), коэффициент равен 3, а для солей, образованных двумя двухвалентными ионами, коэффициент равен 4, т. е. ионная сила соответственно равна молярной концентрации соли, умноженной в первом случае на 3, во втором — на 4.

Ионная сила раствора имеет большое значение при растворении и выделении белков, их очистке, фракционировании и электрохимических исследованиях (электрофорез, определение изоэлектрической точки).

Фракционирование белков органическими растворителями

Этот метод фракционирования основан на уменьшении растворимости белков в присутствии органических растворителей, что обусловливает возрастание агрегации молекул белка, вызываемое уменьшением диэлектрической проницаемости среды

(ДП). Электростатическое притяжение между молекулами, как известно, возрастает обратно пропорционально ДП среды.

Для получения ферментных препаратов экстракт ферментов до или после фракционирования пропускают через иониты, сорбирующие пигментные вещества вытяжки или культуральной жидкости.

Так, катионит СДВ-3 (получаемый сополимеризацией стирола с дивинилбензолом с последующим сульфированием серной кислотой) в Na-форме полностью обесцвечивает ферментный раствор, не вызывая инактивации амилолитических ферментов.

Хорошее обесцвечивание ферментных растворов достигается с помощью катионитов КУ-1, СБС, КФУ, некоторых марок амберлайтов, дуалитов и биполярных ионитов АСД (В-3), АСД (М), а также при перемешивании ферментного раствора в течение 5 *мин* с 1% вещества, называемого Decolorit.

Обесцвечивание ферментных растворов этими ионитами происходит также успешно и в статических условиях.

Используя метод фракционного осаждения диализованных ферментных экстрактов, Л. И. Орещенко разделила ферментативный комплекс гриба Asp. oryzae на амилолитические и протеолитические ферменты.

Фракционирование проводилось осаждением ферментов органическими растворителями. Исследованиями показано, что при 53—56%-ной концентрации этилового спирта в растворе осаждается до 95% протеазы и только 7,5% амилазы.

Полное осаждение амилазы из раствора происходит в том случае, если концентрация этилового спирта в растворе достигает 70%.

Установлена также зависимость растворимости амилазы от pH раствора. Наименьшая растворимость, т. е. максимум осаждения, обнаруживается при pH 5,5—6,4. В данном интервале pH при 56%-ной концентрации этилового спирта осаждается до 40% амилазы, а при других значениях pH всего от 2 до 8%. При pH 5,0—5,1 происходит наиболее полное разделение ферментативного комплекса.

Растворимость (осаждение) протеолитических ферментов значительно меньше зависит от pH среды.

Возможность фракционирования ферментного комплекса органическими растворителями обусловлена различием молекулярных весов или конформаций молекул различных фракций. На рис. 22 представлено осаждение амилазы и протеазы этиловым спиртом.

Здесь уместно отметить, что разделение амилазы и протеазы при указанных концентрациях спирта проходит при температуре, близкой к 0 °С.

На растворимость ферментов, как нами указывалось выше,

большое значение оказывает ионная сила раствора. Изменение ионной силы экстракта ферментов достигается диализом.

Установлено, что при наличии обычно содержащихся в ферментных экстрактах электролитов растворимость амилазы и протеазы снижается с уменьшением содержания электролитов, т. е. снижение ионной силы вызывает снижение растворимости ферментов. Таким образом, содержащиеся в вытяжке электролиты способствуют растворимости комплекса ферментов.

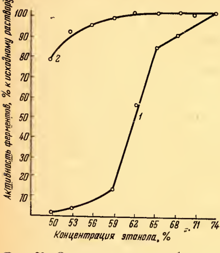


Рис. 22. Осаждение амилазы *1* и протеазы *2* этанолом.

Фракционирование комплекса ферментов имеет большое значение при получении как очищенных, так и высокоочищенных ферментных препаратов. В частности, раздельное получение протеазы и амилазы из комплекса ферментов гриба Asp. oryzae позволит регулировать ферментативный процесс в хлебопечении и пивоварении.

ДИАЛИЗ РАСТВОРОВ

В 60-годах XIX в. английский химик Грэм показал, что через различные животные или растительные полупроницаемые мембраны легко диффундируют электролиты и не проходят вещества, которые после выпаривания образуют вязкие системы, названные Грэмом коллоидами.

Диффузия ионов и молекул низкомолекулярных веществ через пористую мембрану называется диализом. В результате диализа происходит очистка растворов высокомолекулярных веществ, например белков, от нормальных электролитов и молекул низкомолекулярных веществ.

Простейшие диализаторы представляют собой полый стеклянных сосуд, дном которого служит полупроницаемая мембрана (целлофан, коллоидная пленка, пергамент и др.). В этот сосуд наливают раствор, подлежащий очистке от низкомолекулярных веществ, и опускают его в более широкий сосуд, через который протекает дистиллированная вода.

Ускорение диализа достигается путем увеличения поверхности мембраны, перемешиванием раствора, а также увеличением

градиента концентрации по обе стороны мембраны путем большей циркуляции воды во внешнем сосуде.

Большое значение приобрел электродиализ, позволяющий во много раз ускорить процесс очистки растворов. Электродиализатор состоит из трех камер: средней, заполняемой раствором, и двух боковых, отделенных от средней части полупроницаемыми мембранами.

В боковых камерах расположены электроды, которые присоединяются к источнику постоянного тока. Камера имеет отверстия для входа и выхода воды.

Электродиализ позволяет освободиться от следов электролитов и широко применяется для очистки различных белков, а также для фракционирования крахмала на амилозу и амилопектин (амилоза у катода, амилопектин — у анода).

Диализ и электродиализ используются в различных отраслях промышленности, например в производстве искусственного волокна для очистки мерсеризационной щелочи от гемицеллюлозы и тем самым для регенерации NaOH.

Распределение ионов электролита по обе стороны мембраны было впервые теоретически обосновано Доннаном и получило название теории мембранного равновесия Доннана.

Распределение электролитов при диализе и осмосе. Теория Доннана

При разделении мембраной коллоидного электролита от простого электролита, а также нормального электролита от смеси коллоидного и нормального электролитов свободно диффундирующие ионы распределяются неравномерно. Такое распределение впервые обосновал Доннан.

Предположим, что по одну сторону мембраны находится коллоидный электролит (NaR), имеющий общий ион (Na) с нормальным электролитом (NaCl). Обозначим начальную концентрацию коллоидного электролита C_1, а нормального электролита C_2.

Начальное состояние можно представить следующим образом:

$$\begin{array}{cc|cc} Na^+ & R^- & Na^+ & Cl^- \\ C_1 & C_1 & C_2 & C_2 \end{array}$$

(вертикальная черта изображает мембрану).

Коллоидный электролит диссоциирует на радикал R, который не проходит через мембрану, и катион Na. Следовательно, концентрация ионов коллоидного электролита будет $(Na) = C_1$ и $R = C_1$. Нормальный электролит диссоциирует на ионы Na и Cl, концентрации которых равны C_2.

Диффузия ионов Na и Cl через мембрану проходит до установления равновесия.

Если через мембрану прошло x молей NaCl, то, следовательно, равновесная концентрация по обе стороны мембраны будет

$$\begin{array}{ccc|cc} \text{Na} & \text{R} & \text{Cl} & \text{Na} & \text{Cl} \\ C_1 + x & C_1 & x & C_2 - x & C_2 - x \end{array}$$

Обозначим концентрацию иона Na, который перешел в коллоидный электролит $[Na]_1$, а иона Na по другую сторону мембраны $[Na]_2$.

Соответственно концентрацию иона Cl, перешедшего в раствор коллоидного электролита, обозначим $[Cl]_1$, а иона Cl нормального электролита $[Cl]_2$.

При равновесии произведение концентраций диффундирующих ионов по обе стороны мембраны должно быть одинаковым, т. е.

$$[Na]_1 [Cl]_1 = [Na]_2 [Cl]_2,$$

или

$$(C_1 + x) x = (C_2 - x)^2.$$

Выполним соответствующие преобразования

$$C_1 x + x^2 = C_2^2 - 2C_2 x + x^2;$$

$$C_1 x + 2C_2 x = C_2^2; \quad x(C_1 + 2C_2) = C_2^2,$$

откуда

$$x = \frac{C_2^2}{C_1 + 2C_2}.$$

Коэффициент распределения, т. е. отношение концентрации оставшихся ионов к продиффундировавшим, отвечает следующему значению: $\frac{C_2 - x}{x}$, а подставив вместо x его значение $\frac{C_2^2}{C_1 + 2C_2}$, получим

$$\frac{C_2 - x}{x} = \frac{C_1 + C_2}{C_2}.$$

Предположим, что концентрация коллоидного электролита значительно меньше концентрации нормального электролита, т. е. $C_1 < C_2$.

В этом случае концентрацией коллоидного электролита можно пренебречь и, следовательно, коэффициент распределения будет

$$\frac{C_2 - x}{x} = \frac{C_2}{C_2} = 1,$$

т. е. нормальный электролит беспрепятственно будет диффундировать и равномерно распределится по обе стороны мембраны.

Если концентрация коллоидного электролита C_1 значительно превышает концентрацию нормального электролита ($C_1 > C_2$), то коллоидный электролит препятствует диффузии нормального электролита и коэффициент распределения будет

$$\frac{C_2 - x}{x} = \frac{C_1}{C_2}.$$

В табл. 8 приведено рассчитанное распределение KCl для различных отношений $\frac{C_1}{C_2}$ (доннановское распределение).

Таблица 8

Белок C_1	Начальная концентрация нормального электролита C_2	Коэффициент распределения $\frac{C_2 - x}{x}$	$\frac{C_1}{C_2}$	Прошло KCl, %
0,01	1,00	1,01	0,01	49,7
0,10	1,00	1,10	0,10	47,6
1,00	1,00	2,00	1,00	33,0
1,00	0,10	11,00	10,00	8,3
5,00	0,01	101,00	100,00	1,0

Из данных таблицы следует, что только при $\frac{C_1}{C_2} = 0{,}01$ хлористый калий распределяется равномерно по обе стороны мембраны (49,7%).

Распределение нормального электролита по обе стороны мембраны будет сказываться на осмотическом давлении коллоидного электролита, что должно быть учтено при соответствующих расчетах.

Так, если осмотическое давление коллоидного электролита

$$p_к = 2RTC,$$

то осмотическое давление нормального электролита после равновесия

$$p_н = 2RT\,[(C_2 - x) - x] = 2RT\,(C_2 - 2x).$$

Экспериментально найденное осмотическое давление равно разности между осмотическими давлениями коллоидного и нормального электролитов, т. е.

$$p_э = p_к - p_н = 2RT\,(C_1 - C_2 + 2x).$$

Если подставить в последнее уравнение значение x и взять отношение величины наблюдаемого осмотического давления к величине осмотического давления коллоидного электролита, то получим следующую зависимость:

$$\frac{p_н}{p_к} = \frac{C_1 + C_2}{C_1 + 2C_2}.$$

Из данного уравнения следует, что при большой концентрации нормального электролита

$$\frac{p_н}{p_к} = \frac{C_2}{2C_2} = \frac{1}{2},$$

т. е. экспериментально найденное осмотическое давление равно половине осмотического давления раствора коллоидного электролита.

Если концентрация коллоидного электролита значительно превышает концентрацию нормального электролита, то в этом случае, как следует из уравнения, $\frac{p_н}{p_к} = 1$, т. е. наблюдаемое осмотическое давление равно осмотическому давлению коллоидного электролита.

Очистка ферментных растворов диализом

Одним из методов очистки ферментов от растворимых низкомолекулярных примесей является диализ.

Величина коэффициента диализа σ определяется по уравнению Манегольда

$$\sigma = \frac{V}{0,4343S\tau} \lg \frac{\lambda_0}{\lambda_\tau} \text{ см/сек},$$

где V — объем диализуемой жидкости, *см*^{3};
S — полезная площадь мембраны, *см*^{2};
τ — время диализа, *сек*;
λ_0 — начальная удельная электропроводность раствора;
λ_τ — удельная электропроводность раствора к времени τ.

К. П. Степанищев экспериментально определил коэффициент диализа ферментных растворов, показав, что он лежит в пределах $0,9 \div 1,7 \cdot 10^{-4}$ *см/сек*. При непрерывном диализе удаляется до 87% сахара и в среднем 76% сухих веществ.

В результате диализа ферментативная (амилолитическая) активность препарата увеличивается в 2,5 раза.

На рис. 23 показано изменение содержания сухих веществ и отдельно сахара в процессе диализа ферментных растворов.

Следует указать, что после диализа осадок ферментов обладает значительно меньшей липкостью, так как большая часть различных сахаров, декстринов и аминокислот удаляется в процессе диализа.

Коэффициент диализа увеличивается с повышением температуры, что связано с возрастанием коэффициента диффузии.

Если температура диализуемого раствора отличается от температуры растворителя, т. е. проявляется температурный градиент, то коэффициент диализа также возрастает.

Зависимость коэффициента диализа от градиента температуры удовлетворяет следующему уравнению:

$$\sigma_\tau = \sigma_н [1 + 0{,}0277 (t_2 - t_1)] \text{ см/сек},$$

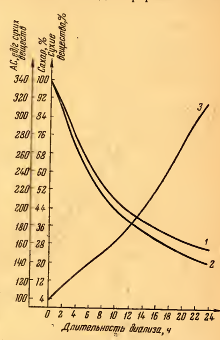


Рис. 23. Изменение содержания сухих веществ *1*, сахаров *2* и амилолитической способности *3* в процессе диализа.

где σ_τ — коэффициент диализа при наличии температурного градиента;

$\sigma_н$ — коэффициент диализа при 18—20 °С;

t_2 и t_1 — соответственно температуры раствора и растворителя.

Если температура раствора 40 °С, а растворителя 5 °С, т. е. разность температур составляет 35 *град*, то коэффициент диализа возрастает в 1,7 раза. Следовательно, образование термодиффузии способствует увеличению коэффициента диффузии.

Приведем некоторые данные о влиянии термодиффузии на коэффициент диализа и электродиализа (σ) раствора хлористого калия (табл. 9).

Таким образом, используя явление термодиффузии при диализе ферментных растворов, можно повысить коэффициент диализа в 1,5—1,7 раза, что тем самым позволит ускорить процесс диализа и уменьшить возможность инактивации ферментов.

Таблица 9

Процесс	Без термодиффузии $t=20$ °C	С термодиффузией $t_2=40$ °C, $t_1=5$ °C
Диализ	$1,96 \cdot 10^{-4}$	$3,14 \cdot 10^{-4}$
Электродиализ	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$4,06 \cdot 10^{-4}$

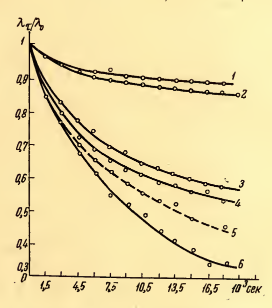


Рис. 24. Изменение скорости удаления электролитов при периодическом (*1* и *2*) и непрерывном (*3* и *5*) диализе и электродиализе (*4* и *6*):
1, 3 и *5* — при скорости растворителя 1 *мл/сек*, *2, 4* и *6* — при скорости 4 *мл/сек*.

Степень очистки ферментных растворов определяется отношением $\frac{\lambda\tau}{\lambda_0}$, где λ — величина удельной электропроводности за время τ; λ_0 — удельная электропроводность исходного диализуемого раствора.

На рис. 24 показано изменение скорости удаления электролитов при периодическом и непрерывном диализе и электродиализе. Средняя сила тока при электродиализе составляла 50 *ма*. Общая продолжительность очистки ферментных растворов при указанной скорости подачи растворителя составляла 8 *ч*.

Величина падения удельной электропроводности очищаемого

раствора обусловлена скоростью раствора и растворителя, т. е. связана с градиентом падения концентрации по обе стороны мембраны.

Коэффициент эффективности очистки растворов диализом зависит от величины осмотического давления, высоты слоя диализуемого раствора и скорости потока растворителя, а также раствора (при непрерывном диализе).

Зависимость диализа от осмотического давления раствора определяется ранее изложенной теорией мембранного равновесия Доннана.

Установлено, что при электродиализе в течение 6 *ч* содержание сухих веществ и зольность вытяжки уменьшаются в 2 раза, а ферментативная активность препарата после диализа соответственно увеличивается (табл. 10).

Таблица 10

Вытяжка	АС	ДС	Сахар, *мг/мл*	Зола	Сухие вещества
	ед/г			%	
Исходная	56,1	0,68	81,8	1,13	7,8
После диализа	87,3	0,62	61,5	0,81	8,5
После электродиализа	130,0	1,43	55	0,65	3,7

Электродиализ в 1,5 раза ускоряет процесс очистки по сравнению с обычным диализом.

При проведении диализа необходимо учитывать, что применяемые мембраны не должны адсорбировать дисперсную фазу, а электрокинетический потенциал мембраны должен обладать тем же знаком заряда, какой имеет диализуемый раствор.

Данное положение было подробно доказано исследованиями Жукова и его сотрудников. Здесь же уместно отметить, что с уменьшением размеров пор мембраны увеличивается ее электрохимическая активность. Отрицательно заряженная мембрана, например целлофан, увеличивает число переноса катиона, а положительно заряженная мембрана (например, пленка из белковых веществ) ускоряет перенос аниона. Это явление следует учитывать при проведении электродиализа растворов.

Весьма желательно, чтобы при проведении электродиализа у анода находилась положительно заряженная мембрана, а у катода — отрицательно заряженная.

При выборе мембраны следует обращать внимание не только на общность знака заряда мембраны и дисперсной фазы раствора, но и главным образом учитывать действие ферментов на прочность мембраны. Так, целлофан довольно быстро разруша-

ется комплексом амилолитических и пектолитических ферментов. Перезарядка целлофановых мембран, как правило, требуется после 10—12 *ч*, а марлин — целлофан, нанесенный на марлю, сохраняет прочность 2—3 суток.

Электродиализ ферментных растворов следует проводить после простого диализа, следя за тем, чтобы pH диализуемого раствора изменялся незначительно.

После осаждения ферментов сернокислым аммонием электродиализ применять не следует, так как pH раствора может снизиться с 6 до 3.

Следует отметить, что при длительном диализе может произойти инактивация ферментов как из-за нестабильности фермента, так и за счет удаления какого-либо кофактора. Не исключено также, что в процессе диализа, а особенно электродиализа, в молекулы ферментов могут попасть из воды ионы металлов, являющихся ингибиторами некоторых ферментов.

Это обстоятельство следует учитывать при диализе ферментных растворов.

Укажем, что ионы кальция в определенной концентрации оказывают стабилизующее действие на молекулу амилазы и способствуют уменьшению действия протеолитических ферментов.

Наблюдаемое уменьшение активности после продолжительного диализа или после выдерживания амилазы в растворах, содержащих фториды, цитраты, оксалаты, может быть объяснено связыванием кальция с указанными реагентами и удалением его из молекулы амилазы, которая содержит не менее 1 *г-атома.*

Качество очистки ферментов в процессе диализа следует контролировать не только по определению электропроводности растворов, но и одновременно по ферментативной активности.

Несмотря на то что в настоящее время имеются промышленные диализаторы и электродиализаторы, диализ ферментных растворов следует практиковать только для получения высокоочищенных ферментов.

В настоящее время ведутся исследования, направленные на установление возможности применения ионообменных мембран для электродиализа и использования ионитов для регенерации растворителя.

ПОВЫШЕНИЕ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ pH РАСТВОРОВ

Белки, как известно, являются амфотерными электролитами, т. е. диссоциируют как кислоты и как основания.

Диссоциация белков в качестве кислоты происходит в щелочной среде при pH>7, так как при этом подавляется действие NH_3^+-групп и белок заряжен отрицательно, в кислой же сре-

де происходит подавление карбоксильных групп и белок диссоциирует как основание и, следовательно, заряжен положительно.

При определенном значении pH белок обладает так называемой изоэлектрической точкой, т. е. значением pH, при котором суммарный заряд его равен нулю и, следовательно, подвижность молекул в электрическом поле также равна нулю.

Следует отметить, что в изоэлектрической точке белок не нейтрален, а обладает равным количеством локализованных положительно и отрицательно заряженных ионов, т. е. является многозарядным, или, как часто говорят, цвиттерионом.

Из сказанного следует, что если значение pH раствора белка выше его изоэлектрической точки, то молекулы белка заряжены отрицательно, а при pH меньше изоэлектрической точки молекулы белка заряжены положительно.

Изоэлектрическая точка определяет многие физико-химические свойства белков. Так, в изоэлектрической точке наблюдается наибольшая лабильность белка в растворе, минимум вязкости и набухания и наименьшее осмотическое давление.

Приведем значения изоэлектрической точки (pH) некоторых белков.

Инсулин	7,0
Химотрипсин	8,6
Глиадин пшеницы	7,1
Зеин кукурузы	6,2
Миоген	6,3
Яичный альбумин	4,55

Нами установлено, что при pH 8,2—8,6 из экстрактов ферментов (амилолитических, протеолитических и пектолитических), полученных из плесневых грибов Asp. oryzae, Asp. niger, выпадает неактивный осадок, удаление которого центрифугированием позволяет почти в 2 раза повысить степень чистоты препаратов, получаемых осаждением спиртом.

При отделении инертного осадка уменьшения активности раствора не происходит.

Содержащиеся в экстракте неактивные примеси P могут быть разделены на три следующие группы:

растворимые низкомолекулярные электролиты (неорганические соли — нормальные электролиты — N),

растворимые углеводы и аминокислоты — I, декстрины, низкомолекулярные фракции белков и продукты их распада — B.

Таким образом, $P=N+I+B$. Обычно $N=1,3\div1,5\%$; $I=1,0\div2,0\%$; $B=1,0\div1,8\%$ и, следовательно, величина P составляет 3,3—5,3%.

Исследование приготовленного раствора из электролита (NaCl), глюкозы, аминокислоты и препарата Asp. oryzae показа-

ло, что растворимые в воде примеси $(N+I)$ полностью растворяются в водно-спиртовом растворе, концентрация которого соответствует содержанию спирта после осаждения вытяжки.

Следовательно, растворимые примеси не оказывают влияния на чистоту ферментных препаратов, получаемых осаждением спиртом.

Таким образом, повышение степени чистоты ферментных препаратов достигается путем изменения pH вытяжки до 8,6 с последующим центрифугированием или сепарированием.

Следует отметить, что описанный способ удаления балластных примесей из вытяжки позволяет обойтись без диализа, который следует практиковать только для получения кристаллических препаратов, а также высокоочищенных препаратов, используемых для медицинских целей.

Приведем данные увеличения амилолитической активности ферментного препарата, полученного путем осаждения этиловым спиртом вытяжки гриба Asp. oryzae до и после отделения неактивных примесей путем повышения pH.

АС вытяжки, *ед/мл*	6,6
Взято вытяжки на исследование, *мл*	100
Получено осадка, *г*	1,2
Неактивные примеси после повышения pH, *г*	0,7
Осадок после отделения неактивных примесей, *г*	0,48
Активность АС, *ед/г*	
до отделения неактивных примесей	415
после отделения	1040

Последующие исследования в полузаводских условиях и заводские испытания подтвердили высокую эффективность описанного способа повышения степени чистоты ферментных препаратов, в связи с чем он включен в технологические схемы заводов ферментных препаратов.

Изменение (повышение) pH экстракта ферментов до 8,2—8,6 путем добавления аммиака или едкого натра вызывает образование изоэлектрического состояния многих входящих в вытяжку неактивных белковых соединений, в результате чего резко уменьшается их устойчивость, т. е. растворимость. Происходит агрегация молекул этих белков с последующей седиментацией их.

Процесс осаждения неактивных белковых веществ значительно облегчается, если предварительно в экстракт ферментов Asp. oryzae добавлено 0,2—0,3% хлористого или уксуснокислого кальция.

Добавление в белковый раствор ионов кальция приводит к созданию мостичных связей или комплексных соединений за счет водородных связей между цепями белковых молекул и тем самым способствует образованию разветвленных агрегатов.

Тагер указывает, что для создания одной связи между дву-

мя цепями полимера достаточно одной молекулы окиси кальция, чтобы цепи оказались «сшитыми» одна с другой. При молекулярном весе полимера 56 000 достаточно 56 *г* окиси кальция, т. е. 0,1% от веса полимера.

Полученные нами результаты подтверждают это положение.

В дальнейшем (в главе V) будет показано, что добавление солей кальция способствует улучшению качества (физической структуры) осадка, а также уменьшению количества этилового спирта, расходуемого для осаждения ферментов.

Обработка культуральной жидкости или экстракта грибной культуры фосфатом кальция с последующим повышением pH приводит также к осаждению фосфата кальция, увлекающего с собой отдельные примеси ферментов.

Если раствор культуральной жидкости трудно освобождается от клеток путем фильтрации, то добавление фосфата кальция способствует значительно лучшей фильтрации и центрифугированию. Добавление диатомита также улучшает фильтруемость культуральной жидкости или ферментного экстракта.

ФИЛЬТРАЦИЯ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ

Использование фильтрующих порошков для очистки различных растворов имеет большое значение для многих отраслей пищевой промышленности.

В фильтрующем слое порошка образуются весьма тонкие поры, обеспечивающие высокую степень отделения мельчайших взвешенных частиц от раствора.

Некоторые высокодисперсные порошки способны также задерживать бактерии.

Порошковый фильтрующий материал можно непосредственно наносить на поверхность фильтрации, которой может служить хлопчатобумажная или синтетическая ткань или металлические сита, или добавлять в фильтрующий раствор в количестве 0,1—0,5%.

После фильтрации использованные порошки не регенерируются. Иногда применяют комбинированный метод фильтрации, заключающийся в нанесении порошка на фильтрующую поверхность и добавлении его в раствор.

В качестве фильтрующих порошков чаще всего используют диатомиты, представляющие собой остатки микроскопических кремниевых панцирей одноклеточных водорослей, называемых диатомеями. Частицы диатомитов различного происхождения обладают весьма разнообразной формой и размером 1—100 *мкм*.

Некоторые зарубежные фирмы выпускают диатомовые фильтрующие порошки различной степени дисперсности с разными размерами пор. В. Е. Скриплев приводит следующий химический состав некоторых диатомитов (табл. 11).

Таблица 11

Компоненты	Состав диатомитов различных месторождений, %			
	Инза, СССР	Ахалцихе, СССР	Калифорния, США	Франция
SiO_2	81,9	84,12	89,70	65,75
Al_2O_3	6,05	3,00	3,72	5,10
Fe_2O_3	2,20	0,85	1,09	4,45
Ti_2O_3	—	—	0,10	0,15
CaO	0,80	1,05	0,35	7,10
MgO	0,92	0,81	0,65	0,15
SO_3	0,07	0,29	—	—
R_2O	1,05	1,00	0,82	0,85
Потери при прокаливании	7,59	7,11	3,70	16,55

Пористость хороших диатомитов составляет 80—85% от общего объема. Удельный вес диатомитов равен 2,0—2,2.

Объемный вес порошкообразных диатомитов 112—120 *кг/м*^{3}, а неразмолотого 350—470 *кг/м*^{3}.

Диатомиты могут быть использованы для отделения мицелия и очистки культуральной жидкости перед концентрированием ферментов. Не исключена возможность применения некоторых диатомитов для бактериальной очистки ферментных экстрактов.

Осветление ферментов, получаемых из экстрактов плесневого гриба Asp. oryzae, может проводиться также обработкой уксуснокислым свинцом после диализа раствора.

Акабори разработал метод, позволяющий выделить амилазу в виде комплексной соли при добавлении в раствор риванола. Последующее выпадение кристаллов амилазы происходит из водно-ацетонового раствора в присутствии ацетатного буфера. Выход кристаллической амилазы, обладающей активностью АС 6600 *ед/г*, составляет не более 0,25% от амилолитической активности культуры гриба.

Очистку ферментных препаратов следует проводить в буферных растворах с pH, близким к нейтральному значению.

Для очистки второй (амилазной) фракции, полученной из экстракта гриба Asp. oryzae, от протеолитических ферментов можно с успехом применить бентонит.

По данным Орещенко, после трехчасовой обработки бентонитом, который следует добавить в количестве 5% к объему раствора, происходит адсорбция 81% имеющейся протеазы, а амилолитическая активность при этом почти не изменяется (потери амилазы составляют не более 2%). При более длительной обработке бентонитом происходит потеря активности амилазы, а сорбция протеазы не увеличивается.

Приведем значения сорбции протеазы бентонитом при различном pH (табл. 12).

Следует подчеркнуть, что бентонит максимально (на 90%) удаляет протеолитические ферменты только из разбавленных растворов. Для полного удаления протеазы из второй фракции следует провести повторное осаждение раствора этиловым спиртом.

Таблица 12

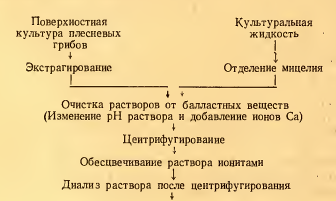
pH	Сорбция, %	pH	Сорбция, %
4,5	71,9	6,6	51,1
5,6	60,9	8,0	15,5

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Получение высокоочищенных и кристаллических ферментных препаратов основывается на проведении ряда последовательных операций, заключающихся в чередовании известных приемов (диализ, хроматография, препаративный электрофорез и др.), которые часто базируются на экспериментальной интуиции в области химии и физико-химии белковых веществ.

Для получения очищенных ферментных препаратов, применяемых в пищевой промышленности, диализ можно не проводить. Очистка растворов от балластных примесей проводится, как было указано выше, путем изменения pH (повышением pH до 8,6) и добавлением солей кальция (уксуснокислого или хлористого кальция) с последующим центрифугированием осадка и осаждением охлажденного раствора этиловым или изопропиловым спиртом.

Приведем принципиальную схему получения высокоочищенных препаратов (амилазы Asp. oryzae).



Фракционирование $(NH_4)_2SO_4$ или спиртом
↓
Диализ
↓
Обработка риванолом. Центрифугирование
↓
Диализ раствора
↓
Охлаждение раствора
↓
Осаждение ферментов этанолом или ацетоном при —5°C

Г. М. Добролинская разделила фракционным осаждением этиловым спиртом глюкоамилазу, глюкозидазу и α-амилазу.

Высокоочищенная глюкоамилаза получилась после фракционного осаждения этанолом и последующего отделения трансгликозилазы на ДЭАЭ-целлюлозе. После диализа проводится высаливание сернокислым аммонием, затем снова диализ и осаждение ферментов ацетоном.

Следует указать, что не все очищенные белки обладают способностью к кристаллизации. В отдельных случаях добавление некоторых низкомолекулярных веществ, образующих комплекс с белком, приводит к кристаллизации. Так, инсулин кристаллизуется в виде комплекса с ионом цинка.

Бреслер указывает, что иногда кристаллизация белков приводит к образованию твердых растворов, а не к кристаллизации индивидуального белка.

Таким образом, кристаллизация белков — это весьма сложный процесс, который часто зависит от интуиции и искусства экспериментатора.

Степень чистоты ферментов определяется по ферментативной активности, отнесенной к единице веса препарата или к единице белкового азота.

Конформация молекул, их гидратация и электрокинетический потенциал при определенном pH, а также сорбция ионов оказывают влияние на электрофоретическую подвижность молекул белка.

Электрофоретическая гомогенность определяется при определенном градиенте потенциала в условиях отсутствия тепловой конвекции. Необходимо учитывать также ионную силу буферного раствора и вести определение при нескольких значениях pH и ионной силы, а также в различных системах буферных растворов.

При небольших электрофоретических различиях происходит продвижение только одной границы.

Более отчетливо гомогенность определяется по седиментации в ультрацентрифуге. Наличие единственного пика при ультрацентрифугировании указывает на содержание только определенного индивидуального белкового вещества.

Определение константы диффузии, а следовательно, и молекулярного веса позволяет также судить о степени гомогенности выделенных ферментов.

При вычислении молекулярного веса высокомолекулярных соединений следует также помнить, что они полимолекулярны. Различают следующие средние значения молекулярных весов, характеризующиеся функцией распределения.

Среднечисловое значение, которое обозначается $\overline{M}_n$, вычисляется из весовых долей w_i высокомолекулярного вещества с молекулярным весом M_i; $w_i = n_i M_i$, где n_i — число, а w_i — вес всех молекул.

Среднечисловой молекулярный вес $\overline{M}_n$ является линейным средним значением и определяется по формуле

$$\overline{M}_n = \frac{\Sigma w_i}{\Sigma n_i} = \frac{\Sigma n_i M_i}{\Sigma n_i}.$$

Средневесовое, или среднемассовое, значение молекулярного веса $\overline{M}_w$ отличается от среднечисловых значений тем, что доля молекулярного веса каждой фракции умножается на соответствующий молекулярный вес, т. е. каждая молекула оценивается ее массой, т. е.

$$\overline{M}_w = \frac{\Sigma n_i M_i^2}{\Sigma n_i M_i}.$$

С увеличением гетерогенности полимера значения средних молекулярных весов изменяются и величина их отношений стремится к определенному максимуму.

Отношение среднечислового молекулярного веса к средневесовому этого максимума

$$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = 2.$$

Значение этого отношения определяет степень гетерогенности данного полимера.

Шульц определил «негомогенность» молекулярных весов уравнением

$$U = \frac{M_w}{M_n} - 1.$$

Значение U может лежать в пределах 0—1.

Определяя значение U, можно проверить гомогенность выделенных фракций белка.

Одним из чувствительных методов оценки гомогенности полученного ферментного препарата является определение его растворимости.

Различное количество анализируемого препарата взбалтывают с определенным количеством воды (или солевого раствора) и после фильтрации или центрифугирования проводят определение содержания белка в полученных растворах и строят график растворимости. По оси ординат откладывают найденное, а по оси абсцисс — взятое количество белка. Первые пробы данной серии показывают, что весь добавленный белок растворяется, т. е. количество его в растворе соответствует количеству добавленного белка. При наличии в исследуемом образце другого белка, обладающего меньшей растворимостью, наблюдается различие в насыщении.

После достижения точки насыщения для белка, обладающего меньшей растворимостью, продолжается растворение другого белка до достижения точки его насыщения.

Прямолинейные отрезки ломаной линии графика растворимости соответствуют определенному белковому компоненту.

Достижение точки насыщения растворимости присутствующих белков определяется тем, что линия графика идет параллельно оси абсцисс.

Нортроп предложил определять гомогенность белка, беря две пробирки с растворителем. В первую добавляется количество белка, которое вызывает слабое помутнение раствора, а во вторую — в 10 раз большее.

Если после центрифугирования растворов в надосадочной жидкости второй пробирки количество белка больше, чем в первой, то в препарате находится более одного компонента.

Наряду с определением растворимости определяется также ферментативная активность надосадочной жидкости.

При получении кристаллических ферментов повторная перекристаллизация может вызвать увеличение удельной активности ферментного препарата до постоянного максимального значения. Необходимо указать, что гомогенность белка может быть определена только на основании данных, полученных несколькими из указанных методов исследования, и нельзя делать вывод о гомогенности по результатам одного из них.

* *
*

Растворимость белков понижается с повышением концентрации нейтральных солей. Высаливающее действие различных ионов пропорционально ионной силе.

Фракционирование белков основывается на различной растворимости компонентов (фракций) в растворе нейтральных солей или органических растворителей (этилового и изопропилового спирта, ацетона и др.).

Возможность фракционирования ферментного комплекса обусловлена различием в молекулярных весах или в конформа-

ции белковых молекул. Используя явление термодиффузии ферментного раствора, можно повысить коэффициент диализа в 1,5—1,7 раза. Зависимость диализа от осмотического давления раствора определяется теорией мембранного равновесия Доннана. Электродиализ ферментных растворов следует проводить после диализа, обращая внимание на то, чтобы pH диализуемого раствора изменялся незначительно.

После осаждения ферментов сернокислым аммонием электродиализ не следует применять, так как происходит значительное снижение pH, что может привести к инактивации ферментов. Повышение pH экстракта ферментов до 8,2—8,6 вызывает образование изоэлектрического состояния многих неактивных белковых соединений, уменьшающее устойчивость с последующим выпадением их в осадок, что повышает степень чистоты ферментных препаратов, получаемых осаждением органическими растворителями. Добавление в раствор ионов кальция приводит к созданию мостичных связей или комплексных соединений, что способствует образованию разветвленных агрегатов.

Гомогенность белка (фермента) основывается на определении данных, полученных на основании сопоставления результатов нескольких известных методов (электрофорез, ультрацентрифугирование, растворимость и ферментативная активность).

Глава IV

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДОМ СОРБЦИИ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИОННОГО ОБМЕНА

В настоящее время ионообменные смолы широко используют в различных областях науки и промышленности: для разделения и выделения различных ионов, в сахарной и фармацевтической промышленности, в биологии и медицине, в аналитической химии и в органическом синтезе в качестве различных катализаторов.

Открытие ионообменных процессов следует отнести к 1850 г., когда Уэй установил явление обмена ионов, находящихся в почве. Процесс ионообменной сорбции на полярных сорбентах был подробно изучен академиком Гедройцем.

Исследования почвоведов показали, в частности, что глинистые материалы (бентонит, асконит, глауконит и др.) обладают сравнительно высокой обменной емкостью. Результаты этих работ послужили основанием для применения указанных ионообменников для умягчения воды. Работы, связанные с водоумягчением, способствовали развитию исследований в области ионообменных процессов.

Многочисленные исследования в области ионообмена позволили найти разнообразные природные иониты и синтезировать различные высокомолекулярные ионообменные смолы.

Процесс ионного обмена обусловлен наличием в ионите активных групп, сообщающих ему кислотный или щелочной характер.

Катионитами, как известно, называют иониты, содержащие активные кислотные группы. Если подвижными ионами являются ионы водорода, то катиониты называются Н-катионитами, или Н-формой катионита.

При замещении ионов водорода катионами металлов катионит называется «солевой формой» и обозначается соответственно, например Na-катионит или Са-форма катионита.

Иониты, обладающие активными группами основного характера и подвижными анионами, называют анионитами. По аналогии с катионитами аниониты находятся в ОН-форме или в форме соответствующего кислотного остатка, например Cl-форма, или Cl-анионит, SO_4-форма, или SO_4-анионит.

Таким образом, катионообменный сорбент должен содержать в своей структуре кислотные группы, ион водорода которых легко обменивается на катион электролита.

Анионообменный сорбент должен содержать в своей структуре группы, обладающие свойством оснований (гидроксил-ион этих групп должен обмениваться на анион электролита).

Ионообменные сорбенты являются высокомолекулярными соединениями, обладающими в подавляющем большинстве случаев пространственной (трехмерной) структурой.

Катионообменные смолы представляют собой продукты поликонденсации фенолов и формальдегида (феноло-формальдегидные катиониты) или сополимеризации (полистирольные катиониты).

Анионообменные смолы — это продукты поликонденсации аминов с формальдегидом или эпихлоргидрином, а также продукты присоединения основных групп к сополимерам стирола (полистирольные аниониты). Иониты могут содержать однотипные или разнотипные группы.

Ионообменный процесс ионитов зависит не только от степени ионизации ионогенных групп сорбента и характера электролитов, но и от структуры макромолекул ионита, его способности к набуханию. Большое значение при ионообмене имеет pH среды. Слабоосновные аниониты ионизируются в растворе электролита при pH ниже 7; сильноосновные аниониты ионизируются в слабокислой, нейтральной, а также в среде с pH выше 7.

Следует отметить, что процесс поглощения на анионитах может одновременно сопровождаться реакцией комплексообразования, которая часто может быть не связана с ионообменом, например

$$2RNH_3OH + MeX_2 = [(RNH_2)_2Me(H_2O)_2]X_2.$$

Обменная способность ионита при обмене равновалентных ионов не изменяется от разбавления. При обмене разновалентных ионов поглощение ионов с большей валентностью увеличивается по мере разбавления раствора, а сорбция ионов с меньшей валентностью уменьшается.

Ионообменные процессы протекают с различной скоростью и длятся от мгновений до несколько минут, часов или даже суток.

Процесс ионного обмена может быть представлен следующей схемой.

Катионный обмен

$$R-Me_1^+ + Me_2^+An^- \rightleftarrows R-Me_2^+ + Me_1^+An^-,$$

$$R-H^+ + Me^+An^- \rightleftarrows R-Me^+ + H^+An^-,$$

$$R-H^+ + Me^+OH^- \rightleftarrows R-Me^+ + H_2O.$$

Анионный обмен

$$R^+An_1^- + Me^+An_2^- \rightleftarrows R^+An_2^- + Me^+An_1^-,$$

$$R^+OH^- + Me^+An^- \rightleftarrows R^+An^- + Me^+OH^-,$$

$$R^+OH^- + H^+An^- \rightleftarrows R^+An^- + H^+OH^-.$$

Ионообменные процессы могут протекать при взаимодействии раствора как с органическими ионитами (крахмал, целлюлоза, лигнин, желатин, древесина, торф, сульфированные угли и синтетические ионообменные смолы), так и с неорганическими ионитами (природные алюмосиликаты — цеолиты, глауконит, бентонит, искусственные алюмосиликаты, гидроокись алюминия, силикагель и др.).

Процесс ионообмена на пермутите может быть представлен следующей схемой

$$2П^-Na^+ + Ca^{+2} + 2Cl^- \rightleftarrows П_2^-Ca^{+2} + 2Na^+ + 2Cl^-,$$

где П-радикал — анион пермутита.

Таким образом, ионообменный процесс, протекающий на органическом или минеральном сорбенте, представляет собой своеобразную химическую реакцию, в результате которой происходит обмен между ионами раствора и ионами адсорбента.

Молекулярная сорбция в отличие от ионообменной протекает на поверхности раздела фаз. Скорость ее равна разности скорости притяжения адсорбируемого вещества и скорости его отрыва, т. е.

$$\frac{dS}{d\tau} = K_1(S_m - S)C - K_2S,$$

где S_m — максимальное значение адсорбции;
S — скорость отрыва;
K_1 и K_2 — константы.

Изотерма ионообменной сорбции подчиняется закону действующих масс, на что впервые указал Раковский.

Для одновалентных ионов уравнение изотермы представляется в следующей форме:

$$\frac{S_1}{S_2} = K_{1,2}\frac{C_1}{C_2},$$

где S_1 и S_2 — адсорбированное количество ионов (в *мг-экв*) на 1 *г* сорбента;
C_1 и C_2 — равновесные концентрации ионов в растворе;
$K_{1,2}$ — константа обмена.

Константа обмена дает количественную характеристику сорбции одного иона по сравнению с другим.

Если $K_{1,2}<1$, то второй ион сорбируется больше, чем первый; при $K_{1,2}>1$ — второй ион сорбируется меньше, чем первый. Если $K_{1,2}=1$, то сорбция обоих ионов одинакова.

Эквивалентность ионного обмена выражается уравнением

$$S_1 + S_2 = S_m = \text{const},$$

где S_m — емкость поглощения ионообменного сорбента.

Гапон (1932 г.) представил изотерму ионного обмена с учетом валентностей ионов и их активностей уравнением

$$\frac{S_1}{S_2} = K_{1,2}\,\frac{a_1^{1/n_1}}{a_2^{1/n_2}}.$$

Как показал Самсонов, ионы антибиотиков не могут взаимодействовать со всеми функциональными группами катионитов, так как большие размеры ионов антибиотиков не позволяют им проникнуть во все части зерна ионитов. Сорбция таких ионов происходит на поверхности ионита или вблизи нее.

Емкость сорбции больших органических молекул (например, антибиотика) определяется по количеству антибиотиков (в любых единицах) поглощенному 1 *г* ионита.

Уравнение изотермы сорбции для больших органических молекул представляется в следующем виде:

$$\frac{m_1^{1/z_1}}{(m-m_1)^{1/z_2}} = K\,\frac{C_1^{1/z_1}}{C_2^{1/z_2}},$$

где m — обменная емкость ионита по отношению к ионам органических соединений;

z_1 и z_2 — заряды соединений.

Емкость сорбции больших молекул ионообменными смолами в значительной мере зависит от степени набухания ионитов и размера их зерен.

В последнее время многие исследователи уделяют большое внимание сорбции биологически активных веществ.

Использование сорбционных методов позволит резко сократить объемы растворов на первой стадии очистки различных ферментов и проводить концентрирование разбавленных растворов.

Данилевский в 1863 г. впервые применил адсорбционный метод для очистки и разделения ферментов.

Изучению адсорбции различных белков посвящено много работ. Некоторые из этих исследований были основаны на образовании адсорбента непосредственно в белковом растворе, например, на адсорбции бензойной кислотой при добавлении бензоата натрия к подкисленному белковому раствору. Молони и Финдлей применили бензойную кислоту для сорбции инсулина.

Следует указать, что одним из первых адсорбентов, использованных для очистки и сорбции белков, был гель гидроокиси алюминия, который получают смешиванием сернокислого алюминия с сульфатом аммония и аммиаком.

Цехмейстер разделил на колонке из боксита галактозидазу, хитиназу и глюкооксидазу.

Вильштетер показал возможность использования геля гидроокиси алюминия для адсорбции панкреатической липазы и дрожжевой инвертазы.

Гулый и Дегтярь разработали способ сорбции глюкозооксидазы окисью алюминия. Сорбцией глюкозооксидазы этим же сорбентом, а также на ионите СГ-1 занимались Покровская и Воробьева.

В лабораторной практике известно использование геля фосфата кальция для адсорбции и хроматографического разделения белков.

Кейлин и Хортли применили гель фосфата кальция при очистке каталазы, Куниц — при получении кристаллической пирофосфатазы; Штрауб применил гель фосфата кальция для выделения кристаллических пирофосфатазы и лактатдегидрогеназы.

Имеются данные об использовании гидроокисей и сульфитов для сорбции белков. Так, Саджер и другие проводили очистку протромбина адсорбцией на гидроокиси магния. Комплекс белка с адсорбентом после центрифугирования разлагали углекислым газом.

Херриот и Нортроп очищали пепсиноген адсорбцией на гидроокиси кальция. Рахмейер и Ходсон использовали сернистый цинк для очистки инвертазы.

Каверзнева с сотрудниками установила возможность сорбции проназы на карбоксильном катионите КМЦ после отделения стрептомицина на катионите КБ-4.

Краузе и Коган после фракционирования экстракта белков пекарских дрожжей сернокислым аммонием пропускали раствор через колонку сефадекса G-75 с последующей сорбцией гелем гидроокиси алюминия, а затем элюцией смогли повысить удельную активность малатдегидрогеназы почти в 20 раз, а дегидрогеназы α-аминомасляной кислоты в 14,5 раза (дегидрогеназы аминокислот — ферменты, катализирующие усвоение неорганического азота путем восстановительного аминирования кетокислот до соответствующих аминокислот).

Демина получила высокоактивные препараты дегидрогеназ с предварительной очисткой растворов с помощью ДЭАЭ-целлюлозы.

Как нами уже указывалось выше, ферменты как диполярные ионы могут нести одновременно как положительные, так и отрицательные заряды. В связи с этим, как отмечает Самсонов, ионообменная сорбция белков значительно осложняется, так как,

кроме электростатического притяжения, должно проявляться и электростатическое отталкивание, которое в ряде случаев имеет весьма существенное значение.

Сорбция диполярных ионов катионитами в водородной форме приводит к превращению диполярного иона в катион и тем самым подавляется действие отрицательного заряда.

Емкость сорбции диполярного иона катионитом в водородной форме во много раз превышает сорбционную емкость того же катионита в солевой форме, так как при использовании солевой формы ионита не снимается второй заряд диполярного иона.

Необходимо подчеркнуть, что при сорбции диполярных ионов не соблюдается эквивалентность обмена ионов.

Процесс ионообмена диполярных ионов катионитом может быть представлен следующим образом:

$$R_1SO_3^-H^+ + H_3N^+R_2COO^- \rightleftarrows R_1SO_3^-H_3N^+ + R_2COOH.$$

Изотерму сорбции диполярных ионов Самсонов представляет следующим уравнением:

$$m_{R\pm} = K_1 \frac{C_{R\pm}}{1 + K_2 C_{R\pm}},$$

где $C_R\pm$ — концентрация диполярных ионов в растворе; K_1 и K_2 — константы.

Из данного уравнения следует весьма важное заключение: сорбционная емкость диполярных ионов связана с концентрацией их в растворе, что, как известно, отсутствует у обычных электролитов.

В ряде случаев различие в сорбционной емкости диполярных и обычных электролитов позволяет отделить диполярные ионы от простых электролитов путем ионообменной сорбции на катионитах в водородной форме.

Сорбция ферментов ионообменными смолами довольно затруднительна и протекает сложнее, чем сорбция аминокислот, белков и антибиотиков.

Ионообменный процесс может привести к частичной или полной инактивации фермента вследствие значительного изменения pH или конформации белковой молекулы.

Кроме того, в ферментном растворе (в вытяжке или культуральной жидкости) всегда содержится определенное количество электролитов, белковых веществ и продуктов их распада, которые препятствуют сорбции ферментов ионообменными смолами.

Сорбция ферментов может осуществляться различными путями, которые нередко проходят взаимозависимо, или одновременно несколькими путями, являющимися стадиями одного общего процесса сорбции определенных ферментов.

Первой стадией механизма сорбции ферментов, а часто и единственной его стадией, является молекулярная сорбция, протекающая без химического взаимодействия с поверхностью сорбента.

Этот процесс происходит главным образом за счет ван-дерваальсовых сил или ионных и мостичных связей. Несмотря на то что молекулярная сорбция обладает малой специфичностью, а сорбент — меньшей сорбционной емкостью, она имеет важное значение при сорбции больших молекул.

Молекулярная сорбция некоторых ферментов определенными ионитами может быть резко повышена за счет процесса высаливания (адсорбция высаливанием), что, как будет показано ниже, проявляется при сорбции амилазы силикагелем и крахмалом.

В процессе молекулярной сорбции большую роль играет пористость сорбента. Молекулярная сорбция больших молекул протекает значительно лучше на поверхности крупнопористых сорбентов, например сорбция амилазы на крупнопористом силикагеле.

Сорбция некоторых ферментов может осуществляться также на основе ионообменного процесса при условии, если в растворе почти отсутствуют или находятся в незначительном количестве ионы неорганических соединений, например сорбция амилазы анионитом ЭДЭ-10П.

Наконец, возможен процесс взаимодействия ионов больших молекул с матрицей сорбента, который одновременно может являться и молекулярным ситом, например диметиламиноэтил-

Таблица 13

Иониты иностранных марок

Марка	Полная обменная емкость, *мг-экв/г*	Исходное сырье
Amberlite IRC-50	10	Метакриловая кислота, дивинилбензол
Zeocarb-216	5,3	То же
Zeocarb-226	9,0	»
Permutit	9,0	—
Dowex S	5,5	Стирол, дивинилбензол
Duolite CS-101	—	Акриловая кислота, дивинилбензол
Lewatit CNO	5	Резорциловая кислота
Wofatit C	7	Метакриловая кислота, дивинилбензол
Zerolit-226	9	—
Wofatit CN	2,0	Резорциловая кислота, формальдегид, фенол
Permutit-216	5,3	—

сефадекс (сефадекс А-50), сорбирующий амилолитические и пектолитические ферменты.

Нами установлено, что сильные катиониты или аниониты не могут быть использованы для сорбции ферментов, и поэтому все дальнейшие исследования были проведены с слабокислотными катионитами и слабоосновными анионитами.

Приведем краткую характеристику некоторых слабокислотных катионитов и слабоосновных анионитов иностранных и отечественных марок, заимствованную из книги Салдадзе, Пашкова и Титова «Ионообменные высокомолекулярные соединения» (табл. 13 и 14).

Таблица 14

Иониты, синтезируемые в СССР

Марка	Активные группы	Полная обменная емкость	Основное сырье
КБ-1	$—COOH$	10,0	Метакриловая кислота, дивинилбензол
АН-15	$—NH_2$	5,5	Стирол, дивинилбензол
КБ-5	$—COOH$ и $—OH$	7,5	Резорцин, монохлоруксусная кислота, формальдегид
КМ	$—COOH$	7,5	Метакриловая кислота
КМТ	$—COOH$	10,1	То же
КРФУ	$—COOH$ и $—OH$	4,0	Фенол, резорцин, монохлоруксусная кислота
ЭДЭ-10П	$—NH_2$; $=NH$, $\equiv N$	—	Этилендиамин, эпихлоргидрин

Названия ионитов иностранных марок происходят от названия фирмы или города, где находится завод, производящий иониты.

Рассмотрим сорбцию амилазы различными ионитами.

СОРБЦИЯ АМИЛАЗЫ СЛАБОКИСЛОТНЫМИ КАРБОКСИЛЬНЫМИ КАТИОНИТАМИ

Ионообменные смолы после соответствующего измельчения (200 меш.) и просеивания промывают нормальными растворами щелочи и кислоты. На 1 *г* ионита следует взять 50 *мл* н. раствора щелочи. Суспензию фильтруют и если после промывки щелочи фильтрат окрашен, ионит продолжают обрабатывать щелочью до удаления окраски.

После этого ионит промывают 1 н. раствором кислоты, затем водой и вносят в колонку, предварительно отделяя суспензию ионита от крупных и очень мелких частиц путем сливания раствора через 1—2 *мин* после приготовления суспензии, а также после вторичного сливания после 20—30-минутного отстаивания.

Для сорбции белков можно использовать как катионит, обработанный после указанной промывки кислотой, получая кислотный Н-катионит, так и щелочно-солевой катионит, например в Na- или Ca-форме.

При обработке анионита (после промывки) кислотой получают, например, Cl- или SO_4-форму анионита, а после обработки щелочью — ОН-анионит.

Таким образом, катионит диссоциирует на малоподвижные анионы и подвижные катионы, а анионит — на малоподвижные катионы и способные к обмену анионы.

Малоподвижные ионы связаны с радикалом элементарного звена ионитов. Следовательно, если белок заряжен положительно, для сорбции его следует выбрать катионит, а при отрицательном заряде — анионит.

Сорбция амилазы карбоксильным катионитом КМТ

Карбоксильный катионит получается сополимеризацией метакриловой кислоты и триазина. Коэффициент набухания его 3,5. Сорбция в статических условиях проходит при внесении в рас-

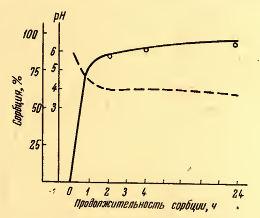


Рис. 25. Сорбция амилазы карбоксильным катионитом в статических условиях. Сплошной линией показана изотерма сорбции, пунктиром — величина pH.

твор не менее 5% катионита КМТ. Если принять активность кристаллической амилазы равной 6000 *ед/г*, то 100 *мл* раствора с активностью 3,4 ед. АС будут содержать 340 ед. АС, или 5,5 *мг* амилазы. Таким образом, на 1 весовую часть амилазы следует взять около 100 весовых частей ионита КМТ.

Кинетика сорбции амилазы из раствора ферментного препарата ионитом КМТ в статических условиях показана на рис. 25. На этом же графике показано изменение pH в процессе сорбции.

Изучение сорбции амилазы в динамических условиях (в колонках диаметром 5 *мм*) показало (рис. 26), что сорбция амилазы достигает 86 ед. АС на 1 *г* ионита КМТ.

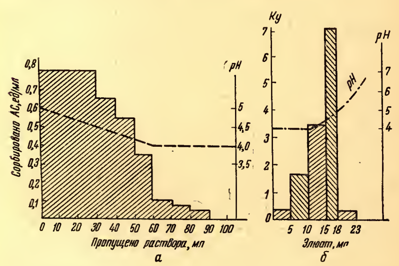


Рис. 26. Сорбция *а* амилазы катионитом КМТ и десорбция *б* в динамических условиях.

Амилаза почти полностью десорбируется буферным раствором pH около 8.

На рис. 26 показано изменение pH и коэффициента концентрирования амилазы в процессе десорбции. Коэффициент концентрирования *К* выражает отношение АС элюата к АС исходного ферментного раствора, т. е. показывает, во сколько раз увеличилась амилолитическая активность раствора.

Исследованиями установлено, что амилаза культуральной жидкости Asp. oryzae не сорбируется катионитом КМТ, а из-за наличия в культуральной жидкости различных электролитов, вступающих в ионообменный процесс с катионитом, происходит инактивирование амилазы вследствие значительного уменьшения pH.

Таким образом, катионит КМТ является хорошим сорбентом амилазы только из разбавленных растворов ферментного препарата.

Сорбция амилазы карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ)

КМЦ — ионообменник, получаемый карбоксилированием целлюлозы монохлоруксусной кислотой. Емкость его зависит от концентрации монохлоруксусной кислоты.

Исследования карбоксиметилцеллюлозы, обладавшей емкостью 0,93 *мг-экв/г*, показали, что в условиях динамической сорбции сорбционная емкость КМЦ составляет всего около 60 ед. АС на 1 *г* сорбента, а десорбция амилазы фосфатным буфером pH 9 не превышает 25% от сорбированного количества амилазы.

Следовательно, по способности сорбировать амилазу карбоксиметилцеллюлоза значительно уступает иониту КМТ.

Сорбция амилазы катионитами СГ

Ионит СГ-1 относится к монофункциональным катионитам полимеризационного типа.

Сорбция амилазы, проведенная в динамических условиях, показала, что катионит СГ-1 в Н-форме сорбирует около 60 ед. АС на 1 *г* ионита, а в статических условиях сорбционная емкость равна 100—110 ед. АС. Необходимо отметить, что в процессе сорбции раствор почти полностью обесцвечивается.

Десорбировать амилазу с данного катионита удалось всего на 30%.

Можно предположить, что функциональные группы амилазы вступают в ионообменный процесс с ионогенными группами данного ионита, а другие группы белковой молекулы сорбируются матрицей карбоксильного катионита и поэтому десорбция амилазы проходит столь незначительно.

Почти аналогичные результаты были получены при сорбции амберлайтом IRC, но десорбция с этого карбоксильного катионита протекала значительно слабее.

Следует указать, что в процессе сорбции амилазы катионитом не происходит изменения pH раствора.

СОРБЦИЯ АМИЛАЗЫ АНИОНИТАМИ

При статическом взаимодействии анионита Dowex в Cl-форме с раствором ферментного препарата или культуральной жидкостью достигается хорошее обесцвечивание раствора без инактивирования амилазы.

Этот же анионит в ОН-форме вызывает заметную инактивацию амилолитических ферментов.

Аналогичное действие оказывает анионит амберлайт IRA-401.

Анионит ЭДЭ-10П, получающийся поликонденсацией полиэтиленамина с эпихлоргидрином, является полуфункциональным

анионитом. Он содержит вторичные и третичные аминогруппы и четвертичные аммониевые группы в радикале алифатического ряда.

Элементарное звено анионита ЭДЭ-10П можно представить следующей схемой:

```
Cl−
—N+—CH2—CH—CH2—N—
 |       |       |
CH2      OH     CH2
 |               |
CH2             CH2
 |               |
NH              NH
 |               |
CH2             CH2
 |               |
CH2             CH2
 |               |
—N—CH2—CH—CH2—N
 |      |       |
        OH
```

Этот анионит, обладающий 10—12% четвертичных аммониевых групп, может при определенных условиях действовать как средне- и сильноосновный анионит.

Анионит ЭДЭ-10П в ОН-форме обесцвечивает ферментный раствор и несколько инактивирует амилазу.

Cl-Форма анионита ЭДЭ-10П сорбирует амилазу из раствора ферментного препарата в количестве 120—140 ед. АС на 1 *г* анионита.

На рис. 27 показан процесс сорбции и десорбции амилазы из приготовленного раствора ферментного препарата. Исходная активность раствора до сорбции составляла 2 ед. АС в 1 *мл*; ферментный раствор подкислялся до pH 4,5. Элюция амилазы проводилась буферным раствором с pH 8.

Как видно из рис. 27, 25% амилазы после десорбции содержится в 10 *мл* элюата.

Таким образом, в результате сорбции и элюции концентрация амилазы в растворе увеличилась почти в 10 раз.

Амилаза культуральной жидкости как с исходным значением pH, так и при pH 4,5 не сорбировалась анионитом ЭДЭ-10П в Cl-форме.

После диализа культуральной жидкости сорбция и десорбция амилазы протекали аналогично сорбции амилазы из раствора ферментного препарата (рис. 28), причем одновременно происходило обесцвечивание культуральной жидкости.

Было установлено, что сорбция амилазы ионообменными смолами (ЭДЭ-10П) зависит от метода и степени очистки ферментов. В табл. 15 приведены результаты сорбции и десорбции

амилазы из раствора комплексного препарата различной степени очистки, полученного из поверхностной культуры Asp. oryzae. Наличие в препарате большого количества инертных примесей (АС исходного препарата 240 *ед/г*) приводит к потере ионитом способности сорбировать амилазу.

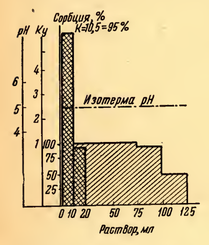


Рис. 27. Сорбция амилазы анионитом ЭДЭ-10П из раствора ферментного препарата.

Рис. 28. Сорбция амилазы из диализованной культуральной жидкости анионитом ЭДЭ-10П (Cl-форма).

Таблица 15

pH раствора	Сорбция	Десорбция	Активность исходного препарата АС, *ед/г*
	АС, *ед/г* сорбента		
4,4	133	132,5	3000
4,5	101	92,8	3000
6,5	120,5	94,3	3000
4,5	55,1	48	740
5,5	50,0	46,5	740
6,6	57,8	43,6	740
4,5	Сорбции нет	—	240
4,5	» »	—	240
6,6	» »	—	240

Сорбция амилазы из растворов комплексного препарата средней очистки (740 *ед/г*) проходит при исходной концентрации амилазы до 3—4 ед. АС в 1 *мл*. Добавление в раствор ферментного препарата 0,5% хлористого натрия вызывает прекращение сорбции амилазы анионитом ЭДЭ-10П. Аналогичное яв-

ление происходит при добавлении в раствор электролитов, входящих в состав культуральной жидкости.

Различные значения сорбции обусловлены не только степенью диализа, но и заметным уменьшением сорбционной емкости анионита после 5—6 регенераций.

Следует отметить, что электропроводность раствора заметно возрастает с увеличением концентрации амилазы, что обусловлено соответствующим увеличением содержания электролитов. Аналогично изменяется электропроводность раствора ферментного препарата при добавлении хлористого натрия или электролитов, входящих в состав культуральной жидкости.

Добавление в ферментный раствор глюкозы и мальтозы не оказывает влияния на сорбируемость амилазы.

Анионит ЭДЭ-10П как в Cl-форме, так и в OH- и смешанной форме не сорбирует амилазу из культуральной жидкости независимо от значения pH.

После диализа культуральной жидкости сорбция амилазы достигает 100 ед. АС и более на 1 *г* анионита ЭДЭ-10П.

Для сорбции амилазы необходимо провести диализ культуральной жидкости в течение 60—72 *ч*.

В процессе диализа культуральной жидкости электропроводность раствора изменяется следующим образом.

Продолжительность диализа, *ч*	Удельная электропроводность, 10^3 $ом^{-1} \cdot см^{-1}$
0	13,5
4	7,9
20	3,8
48	1,3
72	0,6

Таким образом, для возможности сорбции амилазы анионитом ЭДЭ-10П удельная электропроводность раствора не должна превышать $10 \cdot 10^{-3}$ $ом^{-1} \cdot см^{-1}$.

Предварительное пропускание вытяжки Asp. oryzae через иониты, не сорбирующие амилазу, показало, что при этом концентрация вытяжки уменьшается (табл. 16) вследствие частичной сорбции неактивных веществ, однако последующей сорбции амилазы анионитом ЭДЭ-10П не наступает.

Путем изменения (повышения) pH вытяжки до 8,6 с последующим центрифугированием или пропусканием через некоторые сорбенты удается снизить концентрацию вытяжки на 1%, но амилолитическая активность при этом не изменяется.

Пропускание фильтрата (или фугата) через катионит или анионит после изменения pH вытяжки до 8,6 не вызывает дополнительного изменения концентрации вытяжки.

Предварительное пропускание вытяжки через катионит, а за-

Таблица 16

Способ отделения инертных веществ	Концентрация вытяжки, %	
	исходной	после отделения
Изменение pH до 8,6	10,0	9,0
Бентонит	10,0	8,8
Активированный уголь	10,0	8,6
Изменение pH до 8,6	9,4	8,6
Дополнительное пропускание через активированный уголь БАУ	8,6	8,6

тем через анионит и наоборот также не способствовало сорбции амилазы анионитом ЭДЭ-10П.

После отделения инертного осадка и последующего 24-часового диализа сорбция достигла всего 22 ед. АС на 1 *г* анионита.

Таким образом, анионит ЭДЭ-10П в Cl-форме можно с успехом применять для сорбции амилазы из раствора ферментного препарата и из диализованной культуральной жидкости.

Сорбционная емкость этого анионита может достигнуть 175 ед. АС на 1 *г* сорбента, а десорбция буферным раствором — 90—100%.

Попытаемся рассмотреть механизм сорбции амилазы ионитами.

Нами показано, что сорбция амилазы ионообменными смолами из раствора комплексного препарата зависит от степени чистоты препарата. Присутствие примесей электролитов уменьшает сорбцию или приводит к потере ионообменными смолами способности сорбировать амилазу.

Кроме того, установлено, что сорбция амилазы (из раствора препарата) проходит при исходной концентрации амилазы до 3—4 ед. АС в 1 *мл* раствора, а сорбция амилазы из культуральной жидкости протекает только после длительного диализа.

Можно предположить, что при условии очистки от электролитов ионообмен осуществляется между карбоксильными группами фермента, несущими отрицательный заряд, и анионом (Cl) ионита.

Данный процесс можно представить следующей схемой:

$$R^{+}Cl^{-} + Am^{-} = R^{+}Am^{-} + Cl.$$

Не исключено, что ионообменный процесс происходит и между другими полярными группами амилазы, находящимися в активном центре.

Так как амилаза имеет большой молекулярный вес, то присутствие в растворе электролитов обусловливает их значитель-

ную конкурентность по отношению к сорбируемой амилазе: они легко проникают в зерна ионита и занимают его активные ионообменные группы.

Поскольку в растворах препарата амилазы содержится определенное количество электролитов (соли, аминокислоты или другие продукты распада белков), процесс сорбции амилазы затруднен, ибо активные центры ионита вступают в ионообменный процесс с имеющимися примесями и при определенной их концентрации (>0,5%) происходит прекращение сорбции амилазы.

Вследствие этого культуральная жидкость должна быть очищена от имеющихся электролитов диализом, а сорбция раствора комплексного препарата ограничивается его определенной концентрацией.

Не исключено, что наличие электролитов в растворе амилазы при ионообменном процессе вызывает вблизи поверхности ионита также изменение конформации активного центра амилазы и экранирование полярных участков амилазы, участвующих в ионообмене.

Необходимо отметить, что амилаза не может взаимодействовать со всеми группами анионита, так как большие по размеру молекулы амилазы не способны проникнуть во все части ионообменной смолы и сорбция происходит главным образом на поверхности сорбента.

Сорбция ионообменными смолами протеолитических ферментов, как известно из имеющихся данных, проходит в присутствии электролитов, что, по-видимому, объясняется иной конформацией и химической структурой молекул протеазы.

СОРБЦИЯ ФЕРМЕНТОВ СЕФАДЕКСОМ

В последнее время созданы ионообменники на основе полимерных углеводов: крахмала, целлюлозы, декстрана. Наибольший интерес и широкое распространение получили ионообменники, получаемые из целлюлозы, например карбоксиметилцеллюлоза КМЦ (катионит), диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза — анионит, получаемый путем обработки целлюлозы эпихлоргидрином и триэтиламином). Эти ионообменники используются для хроматографической очистки различных белков.

В Швеции (фирма «Фармация») синтезированы ионообменники на основе декстрана. Сшитый полиглюкозид — декстран — назван сефадексом. Особое значение приобретают производные сефадекса — ДЭАЭ-сефадекс, карбокси-сефадекс и сульфо-сефадекс, обладающие в несколько раз большей удельной емкостью по сравнению с целлюлозными ионитами.

Рассмотрим механизм сорбции сефадексами.

Вода в колонке с сефадексом заполняет как внутренние поры зерен геля, так и межзерновое пространство.

Необходимо отметить, что часть воды в зернах геля находится в связанном состоянии (гидратационная) и вследствие этого не может служить растворителем.

Обозначим воду, заполняющую внутренние поры $V_в$, а воду наружную (в объеме геля сефадекса), т. е. воду вне пор геля $V_н$, а объем матрицы геля $V_м$.

Следовательно, общий объем сорбционного слоя сефадекса представляет собой сумму

$$V_о = V_в + V_н + V_м.$$

Коэффициент распределения растворенного вещества внутри зерен геля и окружающей его воды обозначим K. При $K=0$ вещество не поступает в зерна геля или исключается из него. Если K лежит в пределах от 0 до 1, то вещество частично исключается из геля сефадекса, а если значение K превышает 1, то это указывает на адсорбцию между матрицей геля и сорбируемым веществом.

При наличии в исследуемом растворе веществ с $K=1$ и $K=0$ последнее появляется из колонки после достижения объема наружной воды геля сефадекса ($V_н$). Увеличение вытекающего объема на $V_в$ вызывает появление неисключенного вещества, т. е. задерживаемого в порах зерен геля сефадекса, а затем в вытекающем из колонки растворе появляются оба вещества с первоначальным соотношением концентрации.

После достижения указанного равновесия в колонку вводится вода и при достижении объема, равного $V_н$, исключенное растворенное вещество перестает появляться из колонки, а задержанное вещество появляется после достижения $V_н + V_в$.

Применение геля сефадекса позволяет разделять вещества с различным молекулярным весом.

После того как из геля сефадекса выйдут вещества с низким молекулярным весом, колонку можно использовать без регенерации для последующей новой фильтрации.

Основным фактором, вызывающим изменение коэффициента распределения, является размер молекул.

Следует отметить, что разделение веществ с различным молекулярным весом не зависит от их концентрации, но ограничивается вязкостью. Вязкость раствора не должна превышать 10 *спз*.

Если диффузионное равновесие в геле сефадекса устанавливается за малый промежуток времени, то достигается высокая степень разделения веществ.

Сефадекс с крупными частицами ускоряет процесс разделения, но уменьшает степень разделения. При применении такого сефадекса необходимо регулировать скорость потока раствора.

При длительном использовании колонки частицы геля уплотняются и, следовательно, уменьшается их объем (высота слоя).

Фракционирование полимеров на сефадексе протекает в соответствии с их молекулярным весом.

Следует указать, что характеристика различных сефадексов основана на фильтрации через гель декстранов различной степени полимеризации.

Сефадекс изготавливается различной пористости (5 типов пористости).

Сефадекс G-25 — гель, задерживающий вещества с молекулярным весом до 4500, гель сефадекса G-50 — вещества с молекулярным весом 8000—10 000, G-75 — вещества с молекулярным весом 40 000—50 000, G-100 — вещества с молекулярным весом 100 000 и G-200 — вещества с молекулярным весом 200 000.

В соответствии с этим вещества, обладающие бо́льшим молекулярным весом, чем предельно указанные для определенных сефадексов, будут проходить через гель сефадекса вместе с растворителем, а вещества, имеющие молекулярный вес, лежащий в пределах данной марки сефадекса, будут задерживаться в порах геля.

Значительный интерес представляет сочетание эффекта молекулярного сита с адсорбцией матрицей сефадекса за счет ван-дер-ваальсовых сил или ионообменного процесса (производными сефадекса). Для десорбции ферментов, сорбированных на сефадексе, могут быть использованы растворы нейтральных солей. Хорошим элюентом может служить 5—10%-ный раствор хлористого натрия.

В процессе элюции происходит вытеснение сорбируемых веществ из внутренних пор геля сефадекса, т. е. K становится равным нулю.

Нами исследована сорбция амилолитических ферментов сефадексами различных марок (G-25, G-50, G-75, G-100, G-200 и A-50), а также пектолитических ферментов из культуральной жидкости сефадексом A-50.

Установлено, что гели сефадексов марок G-25, G-50, G-75, G-100 и G-200 не сорбируют амилолитические ферменты. Можно предположить, что амилолитические ферменты, имеющие молекулярный вес в пределах 60 000—70 000, не сорбировались даже сефадексами G-100 и G-200 в связи с тем, что находились в сорбционном равновесии с неактивными белками, имеющими значительно больший молекулярный вес, чем амилаза, и тем самым не задерживались внутри зерен геля сефадекса.

Не исключено, что при взаимодействии амилазы с поверхностью сефадекса происходило также изменение конформации молекулы фермента.

Сорбция амилазы на анионит-сефадексе (сефадекс A-50) проходила весьма эффективно (табл. 17).

АС сорбируемого раствора, *ед/мл*	Сорбировано АС на 1 *г* сефадекса А-50	Примечание
4,8	3943	Раствор ферментного препарата,
2,4	2037	полученного из вытяжки гриба Asp. oryzae
1,2	1840	Культуральная жидкость Asp. oryzae
1,0	1454	То же
1,1	1611	»
2,0	1988	»

Полученные данные показывают, что сорбция амилазы из культуральной жидкости может достигать почти 2000 ед. АС на 1 *г* сефадекса А-50 при условии, что исходная амилолитическая активность (АС) более 1 *ед/мл*.

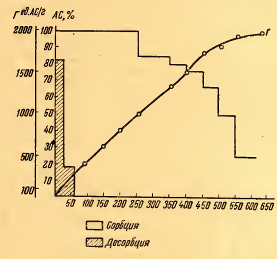


Рис. 29. Сорбция амилазы сефадексом А-50.

Меньшая сорбция амилазы из культуральной жидкости по сравнению с сорбцией из раствора ферментного препарата объясняется большим содержанием электролитов в культуральной жидкости, вызывающих уменьшение коэффициента распределения. Это положение подтверждается тем, что сорбция амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae достигала всего 120 ед. АС на 1 *г* сорбента, что более чем в 15 раз меньше сорбции из культуральной жидкости.

Десорбция амилазы с геля сефадекса раствором NaCl достигала 85—95% от общего количества сорбированной амилазы. На рис. 29 показана кинетика сорбции и десорбции амилазы из культуральной жидкости сефадексом А-50. Средняя концентрация всей извлеченной амилазы в 10—12 раз выше амилолитической активности культуральной жидкости до сорбции.

Установлено также, что сефадекс А-50 сорбирует пектиназу, полученную из глубинной культуры гриба Asp. niger, как в динамических, так и в статических условиях. Это доказывает возможность использования его в качестве сорбента ферментов.

СОРБЦИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СИЛИКАГЕЛЕМ

В последнее время силикагель приобрел большое значение как сорбент многих органических соединений. Получение его основано на реакции взаимодействия растворимого стекла с серной и соляной кислотой. Образующийся золь кремнекислоты через определенное время переходит в гель кремневой кислоты, который отмывается от хлористого или сернокислого натрия и затем высушивается. Для полного обезвоживания полученный силикагель подвергают прокаливанию в токе сухого воздуха при температуре 300—400 °С.

Рис. 30. Сорбция амилазы силикагелем при pH 4,9 (*1*) и 8,6 (*2*).

Наша промышленность выпускает два вида силикагелей различной пористости: мелкопористый и крупнопористый. Оба вида в зависимости от размера зерен подразделяют на следующие марки. Мелкопористый: КСМ — крупнозернистый силикагель мелкопористый, МСМ — мелкозернистый силикагель мелкопористый; крупнопористый: КСК — крупнозернистый силикагель крупнопористый и МСК — мелкозернистый силикагель крупнопористый.

Исследования сорбции амилазы из культуральной жидкости силикагелем МСК с частицами размером 100—120 меш показали оптимальное значение pH 4,7—4,9 (рис. 30).

При значении pH более 5,4 происходит снижение сорбции.

Теоретические основы сорбции амилазы силикагелем

Силикагель, как известно, представляет собой обезвоженный гель кремневой кислоты, структура и свойства которого зависят от способа и условий приготовления.

Методом инфракрасной спектрографии установлено, что поверхность скелета геля покрыта гидроксильными группами

$$
\begin{array}{ccccc}
OH & & OH & & OH \\
| & & | & & | \\
-Si- & O & -Si- & O & -Si- \\
| & & | & & |
\end{array}
$$

Ксерогель сохраняет свой скелет, образованный агрегированными шарообразными частицами, промежутки между которыми заполнены воздухом. Процесс образования геля длится значительное время, в течение которого происходит дальнейший рост первичных частиц и уплотнение его структуры.

Адсорбция молекул воды в основном обусловлена образованием водородных связей с гидроксильными группами поверхности.

Химическое модифицирование силикагеля заключается в создании на поверхности сорбента тех или иных химических соединений.

Для кремнезема, как указывает Киселев, наиболее распространена реакция дегидратации и регидратации.

Замена гидроксилов метильными или другими группами («зонтиками») $-O-Si\begin{matrix}\diagup CH_3 \\ -CH_3 \\ \diagdown CH_3\end{matrix}$ заметно снижает как электростатический, так и электрокинетический потенциал силикагеля.

Сетка геля поликремневой кислоты построена из трехмерных цепей, несущих гидроксильные группы.

Сорбция амилазы силикагелем происходит, по всей вероятности, не за счет ионообменного процесса, как это имеет место для органических ионитов (ионообменных смол), а путем главным образом молекулярной сорбции.

Адсорбция активной поверхностью силикагеля может происходить за счет ван-дер-ваальсовых сил, а также за счет водородных связей силикагеля.

Увеличение сорбции амилазы силикагелем при добавлении в раствор хлористого натрия может быть объяснено изменением электростатического и электрокинетического потенциалов силикагеля.

Необходимо подчеркнуть, что сорбция амилазы силикагелем проходит при pH 4,7—4,9, т. е. в зоне изоэлектрического состояния амилазы.

Как указывают Диксон и Уэбб, в 1948 г. Тизелиус показал, что в присутствии концентрированных электролитов возрастает адсорбция белков, и назвал этот метод адсорбцией высаливанием.

Для осуществления элюции с поверхности силикагеля элюент должен вывести амилазу из изоэлектрического состояния (перевести ее в ионизированное состояние), что достигается применением фосфатного буфера, обладающего pH 8,0—8,4 или раствора Na_2CO_3.

Механизм сорбции осаждением в динамических условиях отличается от сорбции в статических условиях.

Осадочная сорбция (или осадочная хроматография) протекает вследствие наличия практически нерастворимого инертного высокодисперсного вещества, которое называется носителем (в данном случае — силикагелем) и вещества, обладающего хорошей растворимостью (например, хлористый натрий) в растворителе (воде) и вызывающего в определенных условиях осаждения компонента (белка).

Осадок при динамической сорбции (в колонке) образуется в результате взаимодействия осадителя (который обычно наносится или смешивается с носителем) с ионами раствора за счет ионных или ковалентных связей. В результате такого взаимодействия образуется труднорастворимый осадок, фиксируемый адгезионными силами, которые при фильтрации также не позволяют сместить образовавшийся осадок.

Весьма вероятно, что наряду с адгезией происходит механическое задерживание осадка, или его сорбция носителем (силикагелем).

Осадитель (в данном случае хлористый натрий) удерживается носителем (силикагелем) за счет межмолекулярных сил взаимного притяжения или молекулярной сорбции хлористого натрия силикагелем.

При статической сорбции требуется значительно больше осадителя (хлористого натрия), чем при динамической сорбции, так как процесс образования осадка в динамических условиях облегчается.

Фильтрация через колонку с носителем способствует увеличению сопротивления зоны взаимодействия с осадителем вследствие поверхностного осаждения.

Для получения эффекта сорбции осаждением в статических условиях необходимо, чтобы высокодисперсный силикагель взаимодействовал силами Ван-дер-Ваальса или молекулярной сорбции с хлористым натрием почти всей своей активной поверхностью, для чего, естественно, требуется большее количество осадителя (хлористого натрия).

Десорбция (элюция) амилазы, сорбированной в динамических условиях, проводится, как указывалось выше, буферным раствором (pH 8,2), причем вначале удаляется основная часть хлористого натрия без амилазы, а затем, при минимальном содержании сухих веществ в растворе, элюируется амилаза.

Влияние электролитов на сорбцию амилазы

Исследование сорбции амилазы при найденном оптимуме pH показало, что диализ культуральной жидкости приводит к резкому снижению сорбции амилазы (рис. 31).

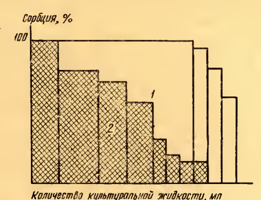


Рис. 31. Сорбция силикагелем амилазы исходной *1* и диализованной *2* культуральной жидкости.

Следовательно, сорбция из очищенных от электролитов растворов культуральной жидкости проходит значительно слабее, что объясняется механизмом сорбции амилазы силикагелем.

Установлено, что с увеличением концентрации амилазы в ферментном растворе сорбция фермента повышается. Так, сорбция амилазы из приготовленного ферментного раствора с активностью АС 12 *ед/мл* составила 60 *ед/г* силикагеля, а при активности 3 *ед/мл* сорбировалось всего 10 ед. АС на 1 *г* сорбента.

При добавлении в раствор препарата амилазы электролитов, входящих в среду для выращивания гриба Asp. oryzae глубинным методом, сорбция амилазы увеличивается.

Исследования, проведенные с вытяжкой гриба Asp. oryzae, полученной поверхностным методом выращивания, также показали, что разведение вытяжки приводит к уменьшению сорбции амилазы.

Так, при амилолитической активности вытяжки 2 ед. АС на 1 *мл* сорбция амилазы составляла 20,6 ед. АС на 1 *г* силикагеля, а при активности вытяжки 12 *ед/мл* она увеличилась до 94 *ед/г* силикагеля.

Следовательно, с увеличением концентрации вытяжки возрастает сорбция амилазы вследствие увеличения концентрации электролитов, обусловливающих изменение структуры микро-

Таблица 18

Концентрация NaCl, %	Сорбировано, ед. АС		Элюировано, ед. АС	
	всего	на 1 *г*	всего	на 1 *г*
Без NaCl	80,0	26,0	86	28,3
2	115,0	38,3	120	40,0
4	186,7	61,2	224	74,3
6	330,7	110,2	338	116,3
10	403,7	134,5	426	142,0

пор силикагеля, а также изменяющих электростатическое притяжение белковых молекул к активной поверхности силикагеля.

Добавление хлористого натрия в культуральную жидкость способствует значительному увеличению сорбции амилазы силикагелем (рис. 32). Без NaCl сорбция амилазы достигает 26 ед. АС на 1 *г* сорбента, а после добавления 6% NaCl она превышает 100 ед. АС (табл. 18).

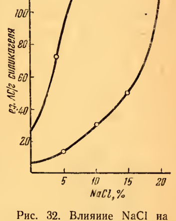


Рис. 32. Влияние NaCl на сорбцию амилазы из культуральной жидкости:

1 — в динамических условиях (силикагель 75—100 меш), *2* — в статических условиях высокодисперсным силикагелем.

Приведенные данные были получены при сорбции силикагелем, измельченным на фарфоровой шаровой мельнице до частиц размером 100—120 меш.

Так как добавление NaCl в раствор культуральной жидкости снижает скорость фильтрации через сорбент, то в отдельных опытах (при добавлении 6 и 10% NaCl) приходилось применять вакуум.

Дальнейшие исследования сорбции проводились со средней пробой силикагеля, измельченного в течение определенного времени на шаровой мельнице. После измельчения в течение 2 *ч* силикагель сорбирует амилазу из раствора ферментного препарата не более 20 ед. АС на 1 *г*. Добавление 6% хлористого натрия увеличивает сорбцию до 72 ед. АС, а добавление 10% NaCl позволяет сорбировать 86 ед. АС.

Следовательно, для сорбции амилазы силикагелем в динамических условиях можно успешно применять не определенную фракцию силикагеля, а среднюю пробу силикагеля, измельченного в течение 2—3 *ч* на фарфоровой мельнице.

Добавление хлористого калия в культуральную жидкость также увеличивает сорбцию амилазы, но меньше, чем добавление NaCl.

Несмотря на то что сорбция амилазы силикагелем с частицами размером 75—100 меш выше по сравнению с сорбцией средней пробой силикагеля, практически значительно удобнее пользоваться нефракционированным силикагелем. В сорбционную колонку можно загрузить большее количество силикагеля всех фракций, и фильтрация раствора протекает без применения вакуума, что имеет определенное практическое значение. На основании проведенных исследований было показано, что сорбция амилазы лучше всего проходит на силикагеле марки МСК.

Силикагель КСМ весьма слабо сорбирует амилазу из раствора культуральной жидкости.

Сорбция амилазы из культуральной жидкости

Для установления оптимальных условий сорбции амилазы силикагелем в динамических условиях исследования проводили в колонках из толстостенного стекла диаметром 100 *мм*.

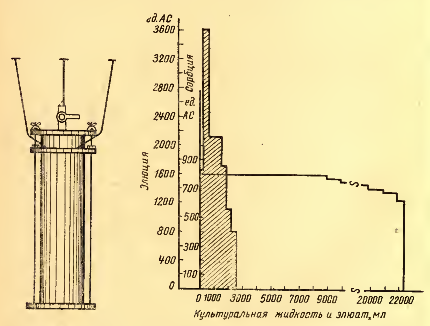


Рис. 33. Сорбционная колонка.

Рис. 34. Кинетика сорбции и десорбции (заштриховано) амилазы культуральной жидкости с добавкой 6% NaCl.

В дно колонки вмонтирована металлическая сетка, на которую укладывается два слоя марли (рис. 33). Колонка заполнялась 500 *г* силикагеля МСК, измельченного в течение 2,5 *ч*. Частицы силикагеля имели размер 4—80 *мкм*. Высота сорбционного слоя составляла 120 *мм*.

Кинетика сорбции и десорбции амилазы из культуральной жидкости с добавлением 6% NaCl показана на рис. 34.

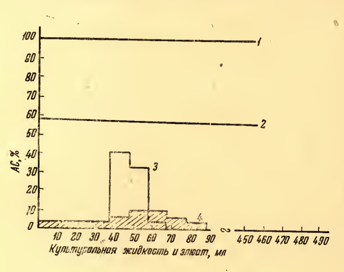


Рис. 35. Сорбция и десорбция амилазы и декстриназы: *1* — сорбция амилазы, *2* — сорбция декстриназы, *3* — десорбция амилазы, *4* — десорбция декстриназы.

Всего через колонку было пропущено 22,4 *л* культуральной жидкости с pH 4,8, в которую было добавлено 6% NaCl. Скорость протекания раствора 1000 *мл/ч*. Всего сорбировалось 16850 ед., что составило 93%.

Элюция амилазы проведена фосфатным буфером с pH 8,04. Всего десорбировано 99% амилазы.

Последующие опыты показали, что сорбция амилазы из культуральной жидкости (с 6% NaCl) измельченным нефракционированным силикагелем составляет 95 и даже 100%, а десорбция 97—99%.

Содержание амилазы в элюате было в 7—9 раз больше по сравнению с исходной амилолитической активностью.

Установлено, что после добавления в культуральную жидкость 6% NaCl в элюате было 2,3% NaCl, и в водно-спиртовом растворе (после осаждения ферментов) — 1,7% хлористого натрия. В полученном препарате 0,5% NaCl.

Таблица 19

Номер опыта	Сорбировано, ед. АС	Процент десорбции
1	25 500	100,0
2	49 810	84,5
3	76 500	93,5

Исследования показали, что сорбция декстриназы проходит параллельно сорбции амилазы, но абсолютное значение сорбции декстриназы составляет примерно 50%, а амилазы 98% (рис. 35).

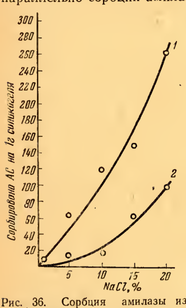


Рис. 36. Сорбция амилазы из культуральной жидкости исходным силикагелем:

1 — сорбция полная, 2 — сорбция до проскока.

Представляло большой интерес исследовать сорбцию амилазы из культуральной жидкости и из вытяжки гриба Asp. oryzae исходным неизмельченным силикагелем в динамических условиях, так как это позволяло в широких пределах изменять скорость прохождения раствора через слой сорбента.

На графике (рис. 36) приведены результаты полной сорбции и сорбции до проскока амилазы из культуральной жидкости исходным силикагелем в зависимости от количества добавленного хлористого натрия.

Десорбция амилазы буферным раствором с pH 8,4 после динамической сорбции проходила на 85—100% (табл. 19).

Сорбция амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae в динамических условиях

В связи с тем что фильтрация вытяжки через измельченный силикагель (75—100 меш) весьма затруднительна и может быть использована только в лабораторных условиях, нами исследовался процесс динамической сорбции амилазы силикагелем МСК без измельчения.

Установлено, что при динамической сорбции амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae исходным силикагелем МСК в вытяжку следует добавлять 20% NaCl и сорбцию вести до момента проскока амилазы.

Сорбция амилазы высокодисперсным силикагелем

Большое значение для сорбции, как известно, имеет степень дисперсности сорбента.

Крупнопористый силикагель МСК и КСК подвергали измельчению на шаровых (фарфоровой и стальной) мельницах и исследовали процесс сорбции амилазы измельченным силикагелем.

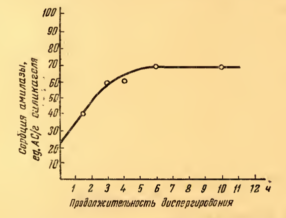


Рис. 37. Зависимость сорбции амилазы от продолжительности измельчения силикагеля.

Силикагель, измельченный в стальной шаровой мельнице в течение 30—40 *мин*, имеет частицы такого же размера (4—12 *мкм*), как и после 5-часового измельчения на шаровой мельнице. Таким образом, скорость измельчения в стальной мельнице в 8—10 раз выше, чем в фарфоровой.

Установлено, что оптимальная продолжительность измельчения силикагеля на фарфоровой шаровой мельнице для сорбции амилазы в динамических условиях должна быть 2—2,5 *ч*, а на шаровой стальной мельнице 10—15 *мин*, что соответствует получению частиц силикагеля размером 4—20 *мкм* и отдельных частиц размером 60—80 *мкм*. Изучение кинетики седиментации частиц силикагеля фотоэлектрическим седиментометром показало, что измельчение в шаровой фарфоровой мельнице более 5 *ч* или 30 *мин* в металлической мельнице практически не влияет на изменение процесса седиментации.

Аналогичные результаты получены измерением седиментации суспензии силикагеля при помощи торзионных весов.

Исследование сорбции амилазы из культуральной жидкости силикагелем различной степени дисперсности показало, что после измельчения силикагеля в шаровой фарфоровой мельнице в течение 10 и 1 *ч* в стальной мельнице достигается неизменность величины сорбции (рис. 37).

Первые опыты сорбции амилазы высокодисперсным силикагелем были проведены с культуральной жидкостью, в которую предварительно добавляли 6% NaCl. Продолжительность сорбции 5—30 *мин* практически не изменяет величины сорбции.

Исследование сорбции амилазы высокодисперсным силикагелем показало, что добавление 6% NaCl к культуральной жидкости не изменяет величины сорбции по сравнению с сорбцией высокодисперсным силикагелем, подвергнутым набуханию в насыщенном растворе хлористого натрия.

Повышение концентрации хлористого натрия способствует увеличению сорбции амилазы.

Добавлено NaCl, %	Сорбция амилазы, ед. АС на 1 *г* силикагеля
6	18,6
10	32,0
15	50,2
20	121,2

Величина сорбции остается практически неизменной при введении высокодисперсного силикагеля как в один прием, так и по частям.

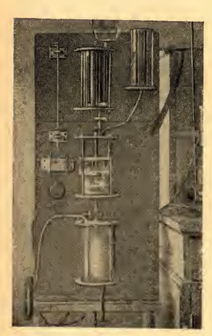


Рис. 38. Стендовая установка для сорбции ферментов.

Сорбция амилазы из культуральной жидкости может превысить 100 ед. АС, если силикагеля взято 1,5—2% к объему культуральной жидкости (см. рис. 36).

Для проведения сорбции в статических условиях нами была изготовлена специальная стендовая установка.

Стендовая установка (рис. 38) состоит из цилиндрического сосуда (из обычного или органического стекла) диаметром 100—200 *мм*, высотой 200—300 *мм*, емкостью 1,5—9,0 *л*, снабженного мешалкой, вакуум-фильтра из органического стекла с механической мешалкой и крышкой (диаметр фильтра соответствует диаметру цилиндрического сосуда, высота его 100—150 *мм*), и из сосуда-сборника, высота и диаметр которого соответствуют размерам цилиндрического сосуда.

Все части установки монтируются на щите из пластмассы, который закрепляется на специальной подставке.

Дно цилиндрического сосуда соединено с металлическим краном, через который раствор направляется в вакуум-фильтр. Дно фильтра также соединено с краном, второй патрубок которого ввинчен в крышку сборника. В днище сборника имеется спусковой кран. В правой стороне щита монтируется сосуд для элюента (буферного раствора или раствора соды) емкостью 10% от емкости цилиндрического сосуда.

В цилиндрическом сосуде и вакуум-фильтре (при элюции) сорбент размешивается мешалкой, приводимой во вращение от электродвигателя. Лопасти мешалки располагаются в 10—15 *мм* от дна сосуда или фильтрующей поверхности вакуум-фильтра.

Сорбция амилазы проводится следующим образом. После доведения pH раствора до оптимального значения (4,7—4,9) и добавления хлористого натрия в цилиндрический сосуд всыпают определенное количество высокодисперсного силикагеля (2% к объему культуральной жидкости) и на 10 *мин* при закрытом кране включают мешалку. Затем открывают кран и при периодическом включении и выключении мешалки раствор направляют в вакуум-фильтр, снабженный специальной фильтрующей тканью.

Чтобы при элюции ткань не поднималась (во время размешивания), внутрь фильтра вкладывают из пластмассы (органического стекла) прижимное кольцо с разрезом, диаметр которого на 10 *мм* больше внутреннего диаметра вакуум-фильтра.

При открытом кране проводят вакуум-фильтрацию путем присоединения патрубка приемного сосуда к вакуум-насосу. При этом на поверхности фильтрующей ткани остается сорбент (силикагель).

Элюент (буферный раствор или раствор соды) заливают в сосуд и определенный объем его выливается на поверхность сорбата (сорбент с сорбированным ферментом). Затем включают на 10—20 *мин* мешалку вакуум-фильтра для элюции амилолитических ферментов, после чего элюат отфильтровывают в сборный сосуд для последующего осаждения органическими растворителями.

Ниже приведены результаты сорбции и элюции амилазы в статических условиях на стендовой установке (табл. 20).

Проверка разработанного статического способа сорбции амилазы культуральной жидкости в полупроизводственных условиях на Московском опытном заводе ВНИИФСа подтвердила возможность 100%-ной сорбции и элюции в пределах 90—94% и получения ферментных препаратов, обладающих амилолитической активностью 1200—2800 ед. АС на 1 *г*.

Исследование процесса элюции амилазы после статической сорбции высокодисперсным силикагелем показало, что десорб-

Таблица 20

Объем культуральной жидкости, *мл*	Сорбировано		Элюировано	
	ед. АС	%	ед. АС	%
1000	860	95,5	840	98,0
1000	840	93,8	750	90,0
1040	868	93,0	857	98,5
490	404	91,7	349	86,3
510	408	88,8	363	89,0

цию амилазы целесообразно проводить вначале 4%-ным, а затем 1%-ным раствором Na_2CO_3. Общий объем элюента составляет около 10% от объема взятой культуральной жидкости.

Ниже приведены обобщенные результаты сорбции амилазы высокодисперсным силикагелем и последующей элюции ее растворами соды (табл. 21).

Таблица 21

Объем культуральной жидкости, *мл*	Активность, ед. АС		Сорбировано		Концентрация элюента, %	Десорбировано		Коэффициент концентрирования *K*
	на 1 *мл*	общая	ед. АС	%		ед. АС	%	
700	0,85	595	595	100	3 1	508	85	8,2
500	1,7	850	700	80	3 1	534	76,2	5,3
530	0,8	424	395	93,3	4 1	423,2	107	11,5
530	1,0	530	492	98,0	4 1	434	90	9,4
510	2,0	1020	979,2	96	4 1	885	90,4	7,25
500	2,0	1000	950	95	4 1	972	100	8,0

Исследованиями установлено, что при добавлении в вытяжку 20% хлористого натрия сорбция достигает всего около 60% при введении 2% высокодисперсного силикагеля. Растворение в вытяжке 28% хлористого натрия и увеличение дозы высокодисперсного силикагеля до 5—8% способствовало увеличению сорбции до 90—98%. Предварительная очистка вытяжки от

инертных балластных веществ путем повышения pH до 8,6 не вызывала увеличения сорбции амилазы.

Таким образом, для статической сорбции амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae необходимо добавить в вытяжку 25—28% NaCl и не менее 5% высокодисперсного силикагеля (в зависимости от амилолитической активности).

Элюция амилазы углекислым натрием (4 и 1%-ными растворами) достигает 80%, а в отдельных опытах около 100% от общего количества сорбируемой амилазы.

В связи с тем что процесс сорбции должен найти широкое практическое применение для концентрирования ферментов, рассмотрим подробнее технологическую схему сорбции амилазы.

Технологические схемы сорбции амилазы силикагелем

Динамическая сорбция (сорбция в колонках, рис. 39). В сборник культуральной жидкости *1* добавляется из бункера *2* хлористый натрий (20% от объема культуральной жидкости), из емкости *3* вливается раствор уксусной кислоты до получения pH 4,7—4,9, перекачиваемой насосом *8*.

Подкисленная культуральная жидкость с добавленным хлористым натрием направляется в сорбционные колонки *6*. До проскока амилолитических ферментов раствор, проходящий через колонку (не содержащий ферментов), направляется в канализацию или может быть использован в животноводстве в качестве добавки к барде или комбикормам.

Элюция амилолитических ферментов проводится пропусканием элюента (буферный раствор с pH 8,2), подаваемого насосом *9* из сборника *10* в емкость *5*. Элюат собирается в емкости *7* и направляется на осаждение спиртом. Перед осаждением элюат подкисляется уксусной кислотой до pH 5,3—6,0.

Для регенерации колонки через силикагель пропускают 1 н. раствор соляной кислоты, перекачиваемой насосом *12* из сборника *13* в сборник-дозатор *4*.

Статическая сорбция (рис. 40). Культуральная жидкость после добавления хлористого натрия из сборника *2* сливается в емкость *1*, где проводится сорбция силикагелем, поступающим из бункера *4* автоматических весов *3*. В емкости *1* установлена мешалка, которая интенсивно размешивает высокодисперсный силикагель с подготовленным раствором культуральной жидкости.

После 10-минутной сорбции отделяют сорбат от раствора путем вакуум-фильтрации или центрифугирования на саморазгружающейся центрифуге *5*. Элюцию ферментов проводят путем размешивания с элюентом, поступающим из чана *8* в дозатор *7*.

Элюент (раствор Na_2CO_3) поступает на вакуум-фильтр с мешалкой (или после отделения на центрифуге) и направляется

в специальный чан с мешалкой, где тщательно размешивается с сорбатом в течение 15 *мин.*

Элюат из вакуум-фильтра сливается в чан *6* после отделения силикагеля на центрифуге.

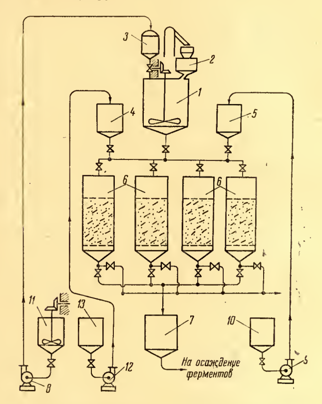


Рис. 39. Принципиальная технологическая схема сорбции амилазы силикагелем в динамических условиях.

Перед осаждением ферментов спиртом элюат необходимо подкислять до pH 5,5—6,0.

Установлено, что для осаждения амилолитических ферментов из элюата лучше всего применять изопропиловый спирт.

Высокодисперсный силикагель получают измельчением силикагеля марки МСК или КСК на шаровой мельнице *11*.

Регенерировать силикагель можно термическим методом (нагревом в муфельной печи при 400 °С в течение часа или в сушильном шкафу при 160 °С в течение 5 *ч*), а также химическим методом — путем промывки 1 н. раствором соляной кислоты *13* с последующей промывкой водой *10*.

Анализ показал, что себестоимость 1 *кг* препарата Asp. oryzae, получаемого методом сорбции, в несколько раз ниже себестоимости препарата, получаемого непосредственным осаждением, так как расход спирта на осаждение ферментов, полученных методом сорбции, в 8—10 раз меньше.

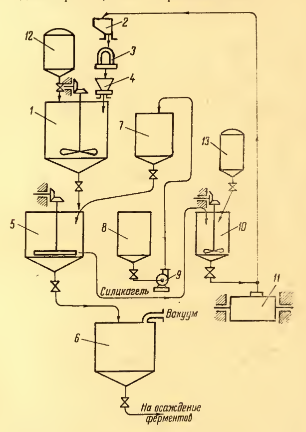


Рис. 40. Принципиальная технологическая схема сорбции амилазы в статических условиях.

Необходимо также отметить, что препараты, получаемые методом сорбции, обладают большей степенью чистоты.

СОРБЦИЯ АМИЛАЗЫ КРАХМАЛОМ

Сорбция амилазы крахмалом может быть использована не только для препаративного получения амилазы, освобожденной от протеазы, но и для получения сорбата, т. е. комплекса амилаза — крахмал. Сорбция амилазы на крахмале обусловлена

главным образом так называемой сорбцией высаливанием, хотя первым этапом этого сорбционного процесса является взаимодействие поверхности молекул крахмала с ферментом (амилазой). Следует подчеркнуть, что только взаимодействие амилазы с крахмалом (без добавления в раствор электролита) приводит к весьма незначительной сорбции амилазы (Шульман, Вайнер).

Нами установлено, что амилаза бактериального происхождения значительно легче сорбируется картофельным крахмалом, нежели грибная амилаза, что обусловлено различием их молекулярной структуры (размер и конформация молекул).

Сорбционная емкость крахмала, сорбирующего бактериальную амилазу, во много раз больше сорбционной емкости того же крахмала, сорбирующего грибную амилазу при равных концентрациях амилазы и равном содержании электролитов в растворе (табл. 22).

Таблица 22

АС исходного раствора, *ед/мл*	Добавлено электролитов $(NH_4)_2SO_4$, %	Сорбция, ед. АС на 1 *г* крахмала	
		грибная амилаза	бактериальная амилаза
10	20	140	3 480
20	40	3640	13 000
40	20	—	10 320
40	20*	1340	11 200

* Плюс соли, содержащиеся в культуральной жидкости.

Необходимо подчеркнуть, что при добавлении менее 20% сернокислого аммония в раствор бактериальной амилазы резко снижается сорбция амилазы крахмалом. Сорбция проходит при 0—2° С.

Проведенные исследования показали, что после упаривания культуральной жидкости и добавления 20% сернокислого аммония сорбция достигает 2000 ед. АС, если упаренная культуральная жидкость обладает активностью 15 *ед/мл* и 10 600 ед. АС на 1 *г* крахмала после упаривания культуральной жидкости до активности 26 ед. АС/*мл*.

Нами установлено, что сорбция амилазы проходит лишь только после определенной термической обработки крахмала.

Клейстеризованный крахмал не сорбирует амилазы. Необходима такая подготовка крахмала, в результате которой из него освобождалась бы только часть амилозы. В связи с этим нами рекомендуется проводить термическую модификацию крахмала при 80—85° С с добавлением 70% воды и 10% диатомита.

После смешения картофельного крахмала с водой смесь нагревают до указанной температуры в течение 40—50 *мин* с

последующим высушиванием при температуре 35—40 °С и измельчением на шаровой мельнице, а затем просеивают через сита с ячейками размером 75—100 меш.

Общая сорбция после трех добавок крахмала достигала 98%, причем после первой добавки сорбция составляла 70—80%.

Амилаза почти полностью десорбируется при температуре 40° С раствором, состоящим из 0,1% Na_2CO_3 и 0,15% $(CH_3COO)_2Ca$.

Установлено, что в результате такой термической модификации коэффициент набухания крахмала при комнатной температуре достигает 4,5 и при этом освобождается 9% амилозы от ее общего содержания в крахмале. Метод определения набухания и фотоколориметрический анализ йодкрахмальной реакции суспензии может служить критерием оценки качества модифицирования крахмала с точки зрения пригодности его для сорбции амилазы.

Можно предположить, что начальной стадией сорбции амилазы крахмалом является взаимодействие активных групп амилазы с гидроксильными группами частично освобожденной амилозы, а затем уже происходит процесс сорбции высаливанием. Степень освобождения амилозы играет большую роль: при слишком большом освобождении ее сорбция амилазы уменьшается.

СОРБЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И ДРУГИХ ФЕРМЕНТОВ

Рассмотренные нами физико-химические закономерности сорбции амилазы ионитами в значительной степени будут справедливы и для сорбции других ферментов.

Мы отмечали выше, что Гулый и Дегтярь, а также Покровская и Воробьева разработали способ сорбции глюкозооксидазы окисью алюминия.

Глюкозооксидаза может найти широкое применение в пищевой промышленности, так как небольшие добавки этого фермента способствуют сохранению качества овощных консервов, сухих дрожжей, стабилизации пива и других продуктов, удаляя следы кислорода и глюкозы.

Связывание глюкозооксидазой кислорода внутри металлических банок резко уменьшает их коррозию. Глюкозооксидаза (микроцид) широко применяется в медицине при лечении различных ран, а также для определения глюкозы в различных биологических жидкостях.

По данным Покровской и Воробьевой, сорбция глюкозооксидазы ионитом СГ-1 проходит на 91% при добавлении в раствор 4% сорбента. Десорбция глюкозооксидазы осуществляется несколькими порциями буферного раствора с pH 7 и достигает около 50% от сорбированного количества.

Этими авторами установлено также, что катионит СГ-1 сорбирует глюкозооксидазу и каталазу как в статических, так и в динамических условиях. Они пришли к выводу, что сорбция глюкозооксидазы ионитом СГ-1 проходит более эффективно, чем окисью алюминия.

Сконцентрированная глюкозооксидаза осаждается из элюата добавлением 96%-ного спирта (3 объема на 1 объем элюата).

Исследования Е. Д. Каверзневой и Ю. А. Расулина дают основание для разработки технологического процесса концентрирования протеазы Streptomyces griseus сорбцией на КМЦ в динамических условиях с последующей элюцией боратным буфером и лиофильным высушиванием препарата.

Исследованиями Д. Я. Типограф, А. И. Веселова, М. Ван-Ньонга и М. С. Мосичева установлена возможность сорбции сычужных ферментов кизельгуром. Сорбция сычужных ферментов из культуральной жидкости проходит на 85—94% при pH 4,5—6,0 и температуре 5—10 °С. Важно отметить, что авторам удалось отделить сычужные ферменты от протеолитических ферментов, которые не сорбировались данным сорбентом.

Сычужные ферменты элюируют цитратно-фосфатным буферным раствором с pH 6,0.

* *
*

Сорбция ферментов ионитами протекает значительно сложнее, чем сорбция аминокислот, белков и антибиотиков, так как ионообменный процесс может привести к частичной или полной инактивации ферментов вследствие главным образом значительного изменения pH раствора. Содержание в растворе (вытяжке, культуральной жидкости) электролитов препятствует сорбции ферментов ионообменными смолами. Для сорбции ферментов могут быть использованы только слабоосновные аниониты или слабокислотные катиониты. Амилолитические ферменты сорбируются некоторыми ионитами (СГ, КМЦ, ЭДЭ-10П, амберлайтами) только после предварительного диализа раствора.

Разработаны оптимальные условия и принципиальные технологические схемы сорбции амилазы из культуральной жидкости силикагелем в динамических и статических условиях. Приведен механизм сорбции ферментов ионитами. Показано, что сорбция может протекать за счет поверхностно-молекулярного взаимодействия без ионного обмена, а также за счет сил Ван-дер-Ваальса в сочетании с ионообменным процессом и путем так называемой сорбции высаливанием (силикагель, крахмал). Возможна также сорбция ферментов способом гель-фильтрации с одновременным взаимодействием с матрицей молекулярного сита (сефадекс А-50).

Показано, что термически модифицированный крахмал в присутствии сернокислого аммония сорбирует бактериальную амилазу, но не сорбирует протеолитические ферменты.

Глава V

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОСАЖДЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ ИЗ РАСТВОРОВ

ОСАЖДЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Растворение высокополимеров и осаждение их из растворов обусловлено химической природой и структурой полимера и растворителя. Молекулы высокополимерных веществ обладают определенной длиной и гибкостью цепей. Эта гибкость молекулы способствует меньшему взаимодействию между цепями и тем самым значительно облегчает тепловое движение молекул. С увеличением гибкости молекул растворимость полимера улучшается.

В связи с тем что выделение ферментов из раствора органическими растворителями обусловлено изменением полярности среды, влияющей на энергию сольватации, следует выяснить влияние полярности среды на устойчивость растворов.

Поляризация молекул

Известно, что в неполярных молекулах электрические заряды расположены симметрично и, следовательно, дипольный момент неполярных молекул равен нулю (напомним, что дипольным моментом называется произведение величины заряда на расстояние между зарядами).

В полярных молекулах электрические центры тяжести зарядов не совпадают. Эти молекулы сами являются источниками внешнего электрического поля, которое тем интенсивнее, чем больший электрический заряд несет молекула и чем больше расстояние между зарядами, т. е. чем больше дипольный момент. Дипольный момент является векторной величиной, которую можно выразить как сумму дипольных моментов входящих в данную молекулу радикалов.

Внешнее электрическое поле или поле соседних молекул воздействует на полярную молекулу двояко: вызывает смещение зарядов, называемое эффектом деформации и затем ориентирует молекулу в электрическом поле — эффект ориентации. Возникающий при этом индуцированный дипольный момент пропорционален силе поля.

В неполярных молекулах электрические заряды подвижны и внешнее электрическое поле вызывает их смещение и определенное расположение.

Эффект деформации предшествует эффекту ориентации в электрическом поле. Следовательно, конечный эффект взаимодействия неполярных и полярных молекул с внешним электрическим полем качественно одинаков. Этот эффект носит название поляризации.

Поляризация тесно связана с диэлектрической постоянной среды, т. е. величиной, показывающей, во сколько раз ослабляется сила взаимодействия между зарядами внешнего электрического поля в данной среде по сравнению с безвоздушным пространством.

Сила взаимодействия между двумя зарядами e и e', находящимися на расстоянии r один от другого,

$$F = \frac{ee'}{\varepsilon r^2},$$

где ε — диэлектрическая постоянная.

Клаузиус и Моссоти разработали теорию диэлектриков, связывающую поляризацию с диэлектрической постоянной.

Удельная поляризация молекул

$$P_d = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \cdot \frac{1}{d},$$

где d — удельный вес.

Поляризация P зависит от слагаемых, обусловленных, во-первых, электронными смещениями P_ε, во-вторых, атомными или ядерными P_a, и в-третьих, ориентацией уже существующих в молекуле перманентных диполей P_0. Поляризация перманентных диполей может быть вычислена, так как эффект поляризации зависит от теплового движения и уменьшается с повышением температуры.

Уравнение Клаузиуса и Моссоти может быть представлено соотношением:

$$P = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \cdot \frac{1}{d} = \frac{4}{3}\pi n \alpha_0,$$

где n — число молекул в 1 $см^3$;

α_0 — их поляризуемость, т. е. дипольный момент μ, если величина внешнего поля $E = 1$. Чем больше α_0, тем легче смещаются заряды в молекуле.

Из электростатики известно, что дипольный момент выражается произведением

$$\mu = r^3 E,$$

где r — радиус частиц.

Следовательно, при $E=1$ $\mu=r^3$ и уравнение поляризации примет вид

$$P=\frac{E-1}{E+2}\cdot\frac{1}{d}=\frac{4}{3}\pi r^3 n.$$

Величина $\frac{4}{3}\pi r^3 n$ характеризует собственный объем всех молекул, без учета промежутков между ними.

Дебай показал, что молекулярная поляризация P_M обусловлена эффектом деформации и эффектом ориентации:

$$P_M=\underset{\substack{\text{(поляри-}\\ \text{зация от}\\ \text{деформации)}}}{P'}+\underset{\substack{\text{(ориентаци-}\\ \text{онная поля-}\\ \text{ризация)}}}{P''}=\frac{4}{3}\pi N\left(\alpha_0+\frac{\mu^2}{3KT}\right).$$

Поляризация от деформации P' не зависит от температуры и может быть найдена измерением показателя преломления n:

$$P'=\frac{n^2-1}{n^2+2}\cdot\frac{M}{d}=\frac{4}{3}\pi N\alpha_0.$$

Поляризация от ориентации

$$P''=\frac{4}{9}\pi\frac{N}{K}\cdot\frac{\mu^2}{T}.$$

Заменим выражение $\frac{n^2-1}{n^2+2}\cdot\frac{M}{d}=R_M$ (молекулярная рефракция); а выражение $\frac{\varepsilon-1}{\varepsilon+2}\cdot\frac{M}{d}=P_M$ (молекулярная поляризация).

Тогда

$$\mu=0{,}0127\cdot10^{-18}\sqrt{(P_M-R_M)\,T}.$$

Дипольный момент выражается в дебаях; 1 дебай $=1\cdot10^{-18}$.

Приведем значение дипольных моментов отдельных связей и органических соединений.

Связь	$\mu\cdot10^{18}$	Соединение	$\mu\cdot10^{18}$
C—C	0	Вода	1,90
H—O	1,6	Метиловый спирт	1,65
C=O	2,3	Этиловый спирт	1,70
CH_2—C	0,4	Пропиловый спирт	1,66
C—O	0,7	Бутиловый спирт	1,66
C—OH	1,66	Серный эфир	1,15
C—NO_2	3,8	Ацетон	2,75
C—CN	3,4	Хлороформ	1,15
C—NO	3,2	Диоксан	0
C—Br	1,5	Бензол	0
C—NH	1,5	Фенол	1,56

Дебай предположил, что силы, связывающие молекулы в сложные агрегаты, обусловлены дипольным взаимодействием этих молекул.

Дипольный момент является физической константой, характеризующей молекулу в отношении электросимметрии.

Исследование дипольных моментов может облегчить выяснение структурных особенностей молекул.

Ассоциация жидкостей является следствием их полярности. К полярным жидкостям относятся спирты, кислоты, кетоны, альдегиды, соединения, обладающие двойной и тройной связью, группой SH, NH_2, NO, NO_2. К нормальным, неассоциированным, жидкостям относятся углеводороды, эфиры.

Молекулы, обладающие фиксированными зарядами, имеют жесткий дипольный момент и при отсутствии в системе тепловых колебаний, располагаются, связываясь одна с другой противоположно заряженными концами, образуя ассоциаты. Изменение температуры нарушает закономерность расположения.

Другая группа молекул обладает подвижными электрическими зарядами, хотя они в то же время и являются диполями. Их поляризация обусловлена изменением дипольного момента.

Ассоциация молекул может вызывать как увеличение дипольного момента (цепочечная ассоциация), так и его уменьшение (замыкание цепочки).

Агрегация коллоидных частиц тем более вероятна, чем меньше активных групп молекулы занято растворителем.

Плохим растворителем следует считать такой, молекулы которого взаимодействуют с небольшим числом активных групп молекулы растворенного вещества, например белка. Под активными группами следует понимать полярные радикалы, связывающие растворитель.

Необходимо указать, что прибавление органических неэлектролитов к гидрозолям может вызвать у одних из них сенсибилизацию, а у других — стабилизацию.

Установлено, что сенсибилизация возрастает с увеличением молекулярного веса неэлектролита, что связано с уменьшением диэлектрической постоянной. Высокое значение диэлектрической постоянной дает простейшее указание на полярность молекул.

Здесь уместно подчеркнуть, что диэлектрическая постоянная является интегральной величиной, зависящей от свойств входящих в вещество радикалов и от порядка их распределения и взаимоотношений в молекуле.

Полное соответствие между диэлектрической постоянной среды и свойством коллоидной системы можно обнаружить в том случае, если исследовать влияние ДП не всех органических веществ вообще, а в пределах гомологических рядов, характеризующихся постепенным усложнением молекулы и ее свойств в определенном направлении.

Следует указать, что полярные группы полимера обладают независимостью и достаточной свободой вращения в присутствии жидкости, с ними взаимодействующей. При соприкосновении с такой жидкостью полярные группы выключаются, так как их силовсе поле экранируется молекулами растворителя и, следовательно, потенциалы этих групп определяются только их природой. Структурные изменения в растворах высокополимеров в основном обусловливаются изменениями в поступательном движении частиц, но не во вращении диполей.

Влияние химической природы органических растворителей на осаждение ферментов

В конце прошлого века Такамине впервые выделил препарат амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae осаждением этиловым спиртом. Этот способ получил широкое распространение в научных исследованиях и до сих пор используется в промышленности.

Различная растворимость α- и β-амилаз в этиловом спирте позволила исследователям разделить эти ферменты.

Имеются данные о возможности осаждения амилаз метиловым спиртом.

Нинн и Гейтс в 1946 г. предложили использовать для осаждения амилолитического комплекса ферментов изопропиловый спирт, ацетон, а также меньшее против принятого количество этилового спирта.

Калашников также пришел к выводу о целесообразности применения изопропилового спирта вместо этилового, так как было замечено, что для осаждения амилазы требуется меньший расход изопропилового спирта.

Шульман, Демина и Апатцева исследовали влияние химической природы органических жидкостей (спиртов, ацетона, эфиро-альдегидной фракции и добавок к спиртам различных неполярных жидкостей) на осаждение амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae.

Полнота осаждения ферментов органическими растворителями определялась содержанием амилазы (АС) как в осадке после центрифугирования, так и в надосадочной жидкости. Следует указать, что концентрация спирта в реакционной смеси до 80% не искажает результатов определения АС. Это позволило с достаточной точностью вести наблюдения за переходом ферментов в осадок по мере изменения концентрации органического растворителя.

Для установления предельной концентрации растворителя, вызывающей полное осаждение ферментов из раствора, пользовались графическим методом. По оси ординат откладывали амилолитическую активность (в %), по оси абсцисс — концент-

рацию растворителя в смеси (также в процентах) или соотношение объемов растворителя и объема вытяжки.

Исследования были проведены с метиловым, этиловым и изопропиловым спиртами, с ацетоном и со смесями этилового и бутилового, этилового и изоамилового спиртов, этилового

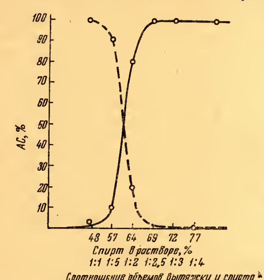


Рис. 41. Осаждение амилазы этиловым спиртом.

спирта с серным эфиром и с эфиро-альдегидной фракцией. Кроме того, исследовалось действие других жидкостей (диоксана, спиртового раствора дихлорэтана), а также добавок некоторых неполярных жидкостей (бензола, ксилола, четыреххлористого углерода) к этиловому спирту.

Установлено, что метиловый спирт инактивирует амилазу на 40—80% при добавлении 4—8 объемов его к одному объему вытяжки.

Исследование кинетики осаждения амилазы этиловым спиртом показало, что для полного выделения амилолитического комплекса следует на один объем вытяжки добавить 2,5 объема 96%-ного этилового спирта, т. е. концентрация спирта в растворе (после осаждения амилазы) должна быть 69—70%.

На рис. 41 показана кинетика осаждения амилазы вытяжки из гриба Asp. oryzae этиловым спиртом. Пунктирной линией обозначено изменение (уменьшение) амилолитической активности вытяжки при соответствующем добавлении спирта, а сплошной линией — амилолитическая активность (в %) образующегося осадка.

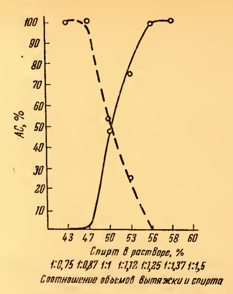


Рис. 42. Осаждение амилазы изопропиловым спиртом.

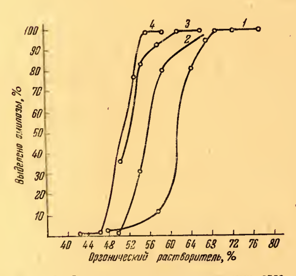


Рис. 43. Осаждение амилазы различными органическими растворителями:

1 — этиловый спирт, *2* — диоксан, *3* — ацетон, *4* — изопропиловый спирт.

Результаты осаждения амилазы изопропиловым спиртом показали (рис. 42), что полное выделение амилазы из вытяжки гриба Asp. oryzae наступает при добавлении 1,35 объема изопропилового спирта к одному объему вытяжки, т. е. при концентрации изопропилового спирта в растворе 56%.

Аналогичные исследования были проведены с другими органическими растворителями (рис. 43). Это дало возможность установить оптимальные концентрации смесей этилового спирта с высшими спиртами, используемых для осаждения амилазы. Так, смесь 1 части этилового спирта с 0,8 части бутилового (рис. 44) осаждает амилолитический комплекс при 59—60%-ной концентрации ее в растворе. Смесь 1 части этилового спирта с 0,4 части изоамилового спирта осаждает амилазу при концентрации 62%. Смесь 1 части этилового спирта и 0,6 части серного эфира вызывает полное осаждение ферментного комплекса при 60%-ной концентрации ее в растворе. Эфиро-альдегидная фракция (продукт, получаемый при ректификации этилового спирта) осаждает амилолитический комплекс при концентрации ее в растворе 64%.



Рис. 44. Осаждение амилазы смесью органических растворителей:

1 — этиловый спирт (1 часть) и бутиловый спирт (0,8 части), *2* — этиловый спирт (1 часть) и изоамиловый спирт (0,4 части), *3* — этиловый спирт (1 часть) и серный эфир (0,6 части), *4* — эфиро-альдегидная фракция.

Осаждение амилазы диоксаном показало, что при двух объемах диоксана практически вся амилаза обнаруживается в светлом осадке.

Добавление к основному растворителю 2% неполярных жидкостей (большее количество их вызывает расслоение жидкостей) не улучшает осаждения и не изменяет распределения активности в осадке и растворе.

Механизм действия органических растворителей

Растворимость высокополимеров в полярных растворителях и в смесях полярного и неполярного растворителей в значительной степени связана с сольватацией полярных групп полимера.

Действие органического растворителя на гидрозоль высокополимерного соединения, например белка, может быть объяс-

нено следующим образом. При растворении в воде притяжение диполей белка (фермента) и воды значительно превосходит взаимное притяжение молекул фермента, в связи с чем образуется устойчивый раствор.

Добавление органического растворителя вызывает уменьшение притяжения активных (полярных) групп фермента к молекулам воды, так как уменьшается количество молекул воды, присоединяющихся к полярным группам белка (фермента), и, таким образом, сила притяжения молекул фермента к водноспиртовому или другому водному раствору органического растворителя ослабевает, т. е. общая энергия сольватации всей молекулы фермента уменьшается.

При определенной концентрации органического растворителя в воде энергия сольватации и энергия теплового движения становятся меньше энергии связи между молекулами фермента, что способствует взаимодействию цепей одна с другой, приводящему к коагуляции.

Следует отметить, что сольватация является процессом адсорбционным, т. е. между скоростью связывания и скоростью отрыва активных групп полимера (белка) с растворителем существует динамическое равновесие.

С увеличением концентрации спирта в водном растворе уменьшается количество полярных групп белка, присоединяющихся к растворителю.

Для объяснения влияния полярности органических растворителей на выделение амилолитических ферментов приведем найденные или вычисленные значения их диэлектрической постоянной, дипольных моментов и молекулярной поляризации (табл. 23).

Так как все спирты имеют один и тот же дипольный момент, равный в среднем $1{,}7 \cdot 10^{-18}$, то на их ассоциацию влияет только углеводородный остаток, который тем больше мешает сближаться молекулам спирта, чем длиннее цепь (в пределах растворимости спирта), т. е. с увеличением молекулярного веса спирта уменьшается степень ассоциации его молекул.

Следует указать, что спирты ассоциируют сначала в виде двойников с моментом, квадрат которого меньше удвоенного квадрата одиночной молекулы. По мере повышения концентрации спирта начинают преобладать тройники с моментом, квадрат которого больше трех квадратов момента одиночной молекулы, а затем начинают преобладать более крупные комплексы, уменьшающие поляризацию.

Таким образом, при изменении (увеличении) концентрации спиртов в молекулярной поляризации появляется как минимум, так и максимум.

Как показали наши расчеты, диэлектрическая постоянная среды, в которой происходит осаждение амилолитического

Таблица 23

Растворитель	Диэлектрическая постоянная (ДП)	Концентрация растворителя, вызывающая полное осаждение ферментов, %	Молекулярная поляризация P_M	Дипольный момент $\mu \cdot 10^{18}$	Примечание
Метиловый спирт	35,4	—	37,20	1,67	Инактивирование амилолитических ферментов до 40% и более
Этиловый спирт	26,1	70	52,08	1,70	
Изопропиловый спирт . .	19,8	56	65,98	1,65	
Бутиловый спирт	17,8	—	91,87	1,66	
Изоамиловый спирт . . .	15,3	—	—	1,80	
Смесь этилового и бутилового спиртов	21,7	60	64,09		
Смесь этилового и изоамилового спиртов . .	22,7	62	62,37	—	
Эфиро-альдегидная фракция	24,0	62	—	—	
Смесь этилового спирта с диэтиловым эфиром . .	16,8	60	53,00	—	
Ацетон	21,04	60	63,91	2,73	

комплекса, лежит в пределах 42—44, а молекулярная поляризация, вычисленная из уравнения P_M смеси (вода и соответствующие растворители), находится в пределах 28—32.

Из данных табл. 23 и рис. 45 видно, что основным фактором, влияющим на осаждение ферментов, является изменение полярности растворителя, характеризуемое диэлектрической постоянной.

Следовательно, уменьшение притяжения активных групп фермента к молекулам воды обусловлено главным образом снижением диэлектрической постоянной среды. Отметим, что это положение справедливо лишь для водных растворов органических растворителей, не вызывающих инактивирования ферментов. Метиловый спирт, например, диэлектрическая постоянная которого равна 35,4, вызывает в водном растворе значительную инактивацию амилолитических ферментов, в связи с чем его не следует применять для осаждения амилолитических ферментов.

Высказано предположение, что предварительное концентрирование вытяжки ферментов в 10—15 раз путем вакуум-выпаривания позволит соответственно уменьшить расход спирта на осаждение ферментов. Рассмотрим правильность этого предположения.

В результате выпаривания растворов ферментов (экстрактов культур плесневых грибов) их вязкость и стабильность резко возрастают вследствие максимальной гидратации ионов протеинов.

Паули установлено, что при осаждении альбумина равными количествами спирта наименьшее количество его выпадает из тех растворов, вязкость которых достигает наибольшего значения.

Коагуляция белка электролитами также зависит от вязкости растворов. С увеличением внутреннего трения смеси белок—кислота требуется большая концентрация свободной кислоты для осаждения белка.

Необходимо подчеркнуть, что в концентрированных растворах белков определение изоэлектрической точки осложняется взаимодействием межионных электрических сил притяжения.

При выпаривании экстрактов ферментов наряду с концентрированием белка происходит и концентрирование электролитов.

Присутствие в растворе некоторых катионов может вызвать понижение активности отрицательного иона амфолита. Концентрация водородных ионов в растворе, при которой белок поглощает из раствора одинаковое количество гидроксильных и водородных ионов, называется изоионной точкой.

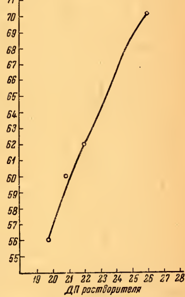


Рис. 45. Влияние диэлектрической постоянной на осаждение амилазы.

В чистых водных растворах изоионная точка совпадает с изоэлектрической точкой. В растворах электролитов происходит сорбция ионов белками. В присутствии солей заряд белковых макромолекул определяется также ионами электролитов. Например, при сорбции белками анионов солей часть гидроксильных ионов из белка вытесняется в раствор и изоионная точка смещается в сторону более щелочных значений pH.

Осаждение ферментов этиловым спиртом из концентрированных растворов (вытяжек) показало, что процесс осаждения из них протекает значительно хуже, чем из растворов средних и слабых концентраций, а расход органического растворителя (спирта) не соответствует повышению концентрации раствора.

Кроме того, качество ферментного осадка, полученного из неконцентрированных растворов, значительно лучше, так как при меньшей вязкости более быстро уменьшается стабильность белкового раствора при добавлении спирта, макромолекулы белка лучше десольватируются, а следовательно, облегчается их агрегация.

Следует отметить, что из культуральной жидкости, упаренной в 5—8 раз, ферменты осаждаются значительно лучше, чем из концентрированной вытяжки, в которой при вакуум-выпаривании концентрируются балластные вещества (белки, соли), содержащиеся в исходной вытяжке в гораздо большем количестве, чем в культуральной жидкости, что, как отмечалось выше, затрудняет осаждение ферментов.

Осадок ферментов или балластных примесей отделяют от раствора в центрифугах или на сепараторах различных конструкций.

Процесс центрифугирования обусловлен центробежной силой, возникающей при вращении барабана центрифуги.

Если обозначить число оборотов ротора центрифуги в минуту через n, а радиус вращения r (в *м*), то окружная скорость вращения будет $\omega = \frac{2\pi r n}{60}$. Обозначим вес вращающегося раствора Q, а ускорение силы тяжести g, тогда центробежная сила

$$C = \frac{m\omega^2}{r} = \frac{Q\omega^2}{gr}\ \text{кгс}.$$

Подставив значение $\omega = \frac{2\pi r n}{60}$, получим

$$C = \frac{Q}{rg}\left(\frac{2\pi r n}{60}\right)^2,$$

или

$$C = \frac{Qrn^2}{900}\ \text{кгс}.$$

Из данного уравнения следует, что увеличения центробежной силы легче достигнуть увеличением скорости вращения барабана, а не его радиуса.

Отношение ускорения центробежной силы к ускорению силы тяжести называется фактором разделения:

$$K_\text{р} = \frac{\omega^2}{rg}.$$

Так как фактор разделения равен центробежной силе, развивающейся при вращении тел весом 1 *кг*, то можно написать, что

$$K_\text{р} = \frac{rn^2}{900}.$$

Ультрацентрифуги с верхним пределом скорости вращения 60 000 *об/мин*, и имеющие ячейку, расположенную на расстоянии 6 *см* от центра вращения, дают увеличение силы тяжести в 250 000 раз.

Влияние электролитов на осаждение ферментов

Выделению ферментов может способствовать присутствие в растворе некоторых катионов, причем избыток многовалентных катионов вызывает инактивирование амилазы (рис. 46).

Как видно из рис. 46, добавление не более 1% хлористого кальция не вызывает инактивирования выделенной амилазы. Добавление от 0,1 до 0,5% хлористого кальция способствует образованию довольно плотных светло-коричневых осадков с заметным уменьшением липкости (на 40—60%), что особенно важно при осаждении вытяжки изопропиловым спиртом.

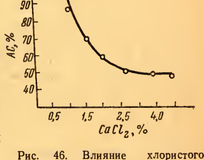


Рис. 46. Влияние хлористого кальция иа амилолитическую активность при осаждеиии комплекса ферментов спиртом.

Осадок ферментов, выпавший в присутствии $CaCl_2$, хорошо отделяется, легко снимается с фильтра и быстрее высушивается.

Добавление в вытяжку хлористого бария или цинка также заметно улучшает качество ферментных осадков, но вызывает потерю ферментативной активности (рис. 47).

Таким образом, для улучшения качества ферментного осадка в вытяжку гриба Asp. oryzae перед осаждением спиртом, и особенно изопропиловым, следует добавить 0,5—1,0% хлористого кальция.

Положительное действие солей кальция на качество ферментных осадков отмечали также Гейтс и Нинн.

Добавление электролитов не только способствует улучшению структуры ферментных осадков, но и дает возможность сократить объем спирта (за исключением изопропилового), расходуемого на осаждение ферментов, что объясняется агрегированием белковых молекул.

Нами установлено, что при добавлении 0,85% солей кальция [$CaCl_2$, CaO, $(CH_3COO)_2Ca$] амилолитический комплекс ферментов полностью осаждается при добавлении 2,1—2,0 объемов этилового спирта вместо ранее установленных 2,5 объемов (рис. 48).

Оптимум концентрации определенного органического раст-

ворителя, вызывающий осаждение различных ферментов, зависит от размеров и конформации молекул белка. Так, если оптимальная концентрация этилового спирта для осаждения ами-

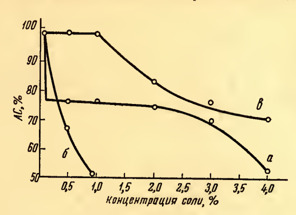


Рис. 47. Влияние хлористого бария (*а*), хлористого цинка (*б*) и хлористого магния (*в*) на амилолитическую активность при осаждении ферментов спиртом.

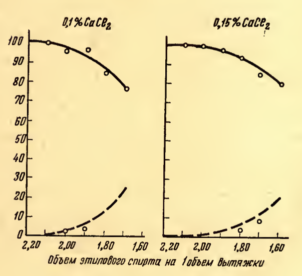


Рис. 48. Влияние хлористого кальция на осаждение амилазы этиловым спиртом.

лазы равна 69—70%, то для протеазы, как показала Орещенко, она составляет 45—50%.

Влияние продолжительности контакта с органическим растворителем на ферментативную активность препарата

При осаждении ферментов органическими растворителями природа растворителя изменяется, в связи с чем степень диссоциации кислых групп белковой молекулы уменьшается и, следовательно, рК их будет возрастать. Это может также привести к изменению третичной структуры белка, поскольку при увеличении значения рК изменяется положение ионогенных групп белковой молекулы.

Значение рК карбоксильных групп зависит от степени окружения их другими белковыми группами, а также радикалами органического растворителя. Аналогично изменяется рК аминной группы.

Осаждение органическими растворителями вызывает частичную инактивацию ферментов, которая будет зависеть как от продолжительности контакта с органическим растворителем, так и от температуры. Повышение температуры вызовет увеличение кинетической энергии белковых молекул, способствующее лучшему контакту ионогенных групп с органическим растворителем, что может привести к изменению конформации активного центра, проявляющемуся в уменьшении ферментативной активности. Понижение температуры белкового раствора повлечет за собой уменьшение растворимости белков (ферментов).

Так, по данным Орещенко, при 0 °С выпадает 48,4% амилазы, при 10 °С — 27,9%, а при 20 °С осаждается 21,9% амилолитических ферментов.

На растворимости протеазы изменение температуры сказывается в значительно меньшей степени, что является следствием различной молекулярной структуры ферментов.

С целью уменьшения степени инактивации ферментов их осаждение следует проводить при охлаждении вытяжки и органического растворителя (спирта или ацетона) до 0—2 °С и при оптимальном значении рН.

Так, при значении рН 5,5—6,0 уменьшается подавление кислотных групп белка при осаждении амилазы органическими растворителями.

Необходимо отметить, что степень инактивации ферментов зависит также и от степени их очистки. Чем меньше степень очистки, тем меньше и инактивация фермента, так как белковая молекула неочищенного фермента защищена поверхностно-активными веществами, обладающими полярностью, средней между полярностью белковой молекулы и водного раствора органического растворителя. Это способствует взаимодействию защитного слоя с раствором органического растворителя и тем самым предотвращает его взаимодействие с молекулой фермента. Как установил П. А. Ребиндер, адсорбция на границе двух

фаз возрастает с увеличением разности в степени полярности этих фаз.

Адсорбция ферментами поверхностно-активных веществ изменяет характер взаимодействия белковой молекулы (фермента) с органическим растворителем.

Нами установлено, что амилаза вытяжки гриба Asp. oryzae меньше подвержена влиянию действия спирта, чем амилаза культуральной жидкости.

Таблица 24

Растворитель	Концентрация растворителя в растворе вытяжки, %	Изменение активности амилазы (в %) при продолжительности контакта, ч					
		0,5	1	2	3	4	24
Этиловый спирт	70	Нет	Нет	4	10	14	30
Эфиро-альдегидная фракция	64	»	»	7	33	40	—
Изопропиловый спирт	58	»	»	Нет	7	7	15

Исследование действия спиртов на амилолитическую активность полученного влажного ферментного осадка показало, что при контакте осадка ферментов с 96%-ным этиловым спиртом через 1 *ч* (при 18—20 °С) амилолитическая активность уменьшается на 7%, через 2 *ч* — на 22% и через 4 *ч* — на 26%.

Изопропиловый спирт вызывает изменение активности препарата после часового контакта на 12%, а через 4 *ч* — на 18%.

Это позволяет заключить, что изопропиловый спирт обладает значительно меньшим инактивирующим действием, что, по-видимому, связано с его меньшей полярностью.

Лосякова и Мишина установили, что увеличение продолжительности контакта пектолитических ферментов с этиловым спиртом до 40 *мин* вызывает уменьшение ферментативной активности препарата на 12%.

Предлагается вести осаждение пектолитических ферментов из вытяжки путем дробного добавления спирта при общей продолжительности контакта с водно-спиртовым раствором оптимальной концентрации в пределах 10—20 *мин.*

Отметим, что этиловый спирт осаждает из вытяжки ферментов значительно больше неактивных (балластных) веществ, чем изопропиловый. Вследствие этого выход препарата при осаждении этиловым спиртом больше, но активность его меньше.

Так, по данным Михайловской, препарат, полученный путем осаждения вытяжки изопропиловым спиртом, содержал 17,0% золы и обладал активностью 600 ед. АС, а препарат, осажден-

ный из той же вытяжки этиловым спиртом, содержал 25,8% золы и имел активность 315 ед. АС на 1 *г*.

Пектолитические ферментные препараты, полученные осаждением изопропиловым спиртом, содержали 7,4% золы, а после осаждения этиловым спиртом — 14,7%.

Растворимость полимерных соединений и их выделение из растворов путем добавления органического растворителя или электролитов зависит и от молекулярного веса. Для осаждения полимеров с большим молекулярным весом требуется меньшее количество осадителя, так как растворимость уменьшается по мере увеличения молекулярной цепи. Таким образом, степень осаждения белков тем больше, чем больше их молекулярный вес.

Большое значение имеет также конформация молекул (пространственная структура), что отражается на вязкости растворов.

Отношение вязкости раствора к вязкости растворителя принято называть относительной вязкостью $\eta_{отн}=\frac{\eta}{\eta_0}$, а величина $\frac{\eta-\eta_0}{\eta_0}=\frac{\eta}{\eta_0}-1$ называется удельной вязкостью ($\eta_{уд}$). Отношение удельной вязкости к концентрации $\frac{\eta_{уд}}{C}$ называется приведенной, или характеристической, вязкостью.

Характеристическая вязкость некоторых белков в водных растворах солей (по Г. Стенфорду)

Белок	Молекулярный вес	(η)	$\frac{b}{a}$
Рибонуклеаза	13 683	3,30	2,9
β-Лактоглобулин	35 000	3,40	2,9
Сывороточный альбумин	65 000	3,70	3,3
Гемоглобин	68 000	3,60	3,1
Каталаза	250 000	3,9	—
Фибриноген	330 000	27	—
Коллаген	345 000	115	—
Миозин	493 000	217	—

Глобулярные белки характеризуются величинами η в пределах 3,3—4,0, а у другой группы белков η намного больше.

Приведем значения вязкости (*н·сек/м²*) ферментных растворов по данным Л. Н. Аганесовой (табл. 25).

Плотность ферментных растворов изменяется от 1,029 при 6%-ной концентрации раствора до 1,364 для 75%-ного раствора.

Лосякова, Мушникова и Мишина установили, что пектолитические ферменты полностью осаждаются этиловым спиртом, если концентрация его в растворе (экстракте гриба Asp. niger) равна 73%. При концентрации спирта в смеси, равной 53,5%,

Таблица 25

Содержание сухих веществ, %	η при t = 20 °C		η при t = 40 °C	
	Asp. oryzae	Asp. niger	Asp. oryzae	Asp. niger
6	0,1195	0,1207	0,07049	0,0781
10	0,1243	0,1327	0,0819	0,0883
20	0,1962	0,2245	0,119	0,1346
30	0,2671	0,3612	0,1501	0,202
40	0,5177	0,8060	0,2634	0,3988
50	1,4343	2,4584	0,5396	1,0258
60	—	31,5300	—	6,5064
70	—	114,5933	—	13,6727
75	—	252,5133	—	60,1006

осаждается более 50% пектолитических ферментов. Таким образом, для осаждения пектолитических ферментов на один объем вытяжки требуется 3—3,5 объема 96%-ного этилового спирта.

Покровская, Оганезова, Чистякова и Кислякова установили, что для осаждения глюкозооксидазы необходимо к одному объему культуральной жидкости добавить 3 объема этилового спирта или 2 объема изопропилового спирта. Ими показано также, что длительность контакта с этиловым спиртом или ацетоном не влияет на активность получаемого препарата.

При понижении температуры выпадает больше осадка, но его ферментативная активность соответственно уменьшается. Для глюкозооксидазы это уменьшение незначительно. Так, при —10° С активность препарата составила 80% от активности культуральной жидкости, а при +10 °С — 79%. Следовательно, осаждение глюкозооксидазы органическими растворителями можно вести без специального охлаждения растворов.

На основании исследований ВНИИФСа был разработан технологический режим осаждения ферментов (амилолитических, протеолитических и пектолитических) в промышленном масштабе.

Диффузионная вытяжка или упаренная культуральная жидкость из сборника подается в смеситель, где смешивается с водным раствором аммиака или раствором едкого натра до pH 8,6 для осаждения неактивных балластных примесей, которые удаляются центрифугированием (большинство ферментов при данном значении pH не инактивируется).

Так как осаждение амилазы спиртом должно проходить при pH 5,5—6,0, то после отделения инертного осадка в вытяжку добавляют уксусную кислоту до установления необходимого значения pH.

После подкисления вытяжку насосом перекачивают в теплообменник для охлаждения до 2—5 °С и затем в сборник. Этило-

вый или изопропиловый спирт предварительно охлаждают до 0—2 °C и подают в смеситель. Количество спирта, подаваемого в смеситель, определяется по ротаметру.

С целью уменьшения расхода спирта и лучшего отделения осадка в вытяжку добавляют 0,2% хлористого кальция.

Из сборника вытяжка поступает в смеситель, где происходит взаимодействие спирта с белками вытяжки, приводящее к осаждению ферментов (и сопутствующих им высокомолекулярных соединений, не осажденных при повышении pH вытяжки). В смесителе спирт с вытяжкой тщательно перемешивается мешалкой в течение 10 *мин.* Из смесителя водно-спиртовая суспензия направляется в центрифугу для отделения осадка ферментного препарата. При этом необходимо следить, чтобы температура ферментного осадка в процессе сепарирования не поднималась сверх 20 °C. Это достигается установлением оптимального режима работы сепаратора и соответствующим охлаждением ферментного раствора и органического растворителя, применяемого для осаждения.

ОСАЖДЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЭЛЕКТРОЛИТАМИ

В главе III мы указывали, что высаливающее действие различных ионов пропорционально величине ионной силы.

Высаливание белков отличается от коагуляции лиофобных коллоидов, к которым применимо правило Шульце—Гарде, гласящее, что коагулирующее действие электролитов резко увеличивается по мере возрастания валентности.

Высаливание является обратимым процессом и проводится солями щелочных металлов высокой концентрации.

Гофмейстер показал, что эффект высаливающего действия зависит от природы аниона соли.

По силе высаливающего действия анионы натриевых солей могут быть расположены в следующий лиотропный ряд: $SO_4 >$ $>$ цитрат $>$ ацетат $> Cl > NO_3 > Br > J > CNS$.

Высаливающее действие катионов первой группы удовлетворяет следующему ряду: $Li > Na > K > NH_4$.

Ионы, обладающие высаливающим действием, вызывают усиление ориентации диполей молекул воды, что способствует уменьшению растворимости.

Гидратация высокополимерных соединений отличается от гидратации ионов тем, что в гидратном слое высокополимера вода упорядоченно ориентирована. Энергия связи воды с полимером (белком) постепенно убывает, т. е. сольватные слои располагаются диффузно. В первом молекулярном слое растворитель обладает меньшей упругостью пара и диэлектрической постоянной, большей плотностью и труднее вымораживается.

Определение сольватации может быть проведено измере-

ниями, основанными на указанных физико-химических свойствах.

Величина сольватации чаще всего определяется по тепловому эффекту смачивания. Думанский показал, что количество химически связанной воды A определяется уравнением

$$A = \frac{Q}{80}\ г,$$

где Q — тепловой эффект, *кал/г*;
80 — тепловой эффект в *кал/г* связанной воды.

При взаимодействии полярных групп полимера с полярным растворителем выделяется до 30 *кал* тепла на 1 *г*, т. е. тепловой эффект растворения положителен ($\Delta H > 0$).

На растворимость ферментов оказывает большое влияние величина pH. В изоэлектрической точке белки обладают минимальной растворимостью. Вследствие этого осаждение ферментов органическими растворителями и электролитами следует проводить при значении pH, близком к изоэлектрическому состоянию, т. е. при котором общий заряд белка равен нулю.

Как известно, в изоэлектрической точке белок не нейтрален, а имеет равное количество положительных и отрицательных ионов.

Так как для высаливания ферментов чаще всего применяют сернокислый аммоний, считаем нужным привести данные растворимости этой соли при различной температуре (табл. 26).

Таблица 26

Температура, °C	Растворимость, г/100 г раствора	Температура, °C	Растворимость, г/100 г раствора
0	41,4	60	46,8
10	42,2	70	47,9
20	43,0	80	48,8
30	43,8	90	49,8
40	44,8	100	50,8
50	45,8		

Весьма часто растворимость сернокислого аммония выражают в *г*/100 *г* воды (табл. 27).

При содержании сернокислого аммония 70 *г* в 100 *мл* воды все белки выпадают в осадок. Обычно полное насыщение сернокислого аммония принимают за 100%, или за коэффициент 1,00, а концентрацию соли, при которой происходит осаждение данного фермента, что устанавливается экспериментальным путем, выражают в процентах от полного насыщения или в виде десятичной дроби.

Таблица 27

Температура, °C	Растворимость, г/100 г воды	Температура, °C	Растворимость, г/100 г воды
—10	68,1	25	76,9
0	70,4	100	102

Протеолитические ферменты из очищенных растворов препарата выпадают при насыщении 0,87—0,95. Орещенко показала, что при насыщении сульфатом аммония 0,48—0,76 выделяются фракции дипептидазы.

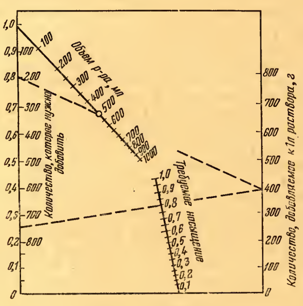


Рис. 49. Номограмма.

Осаждение ферментов сернокислым аммонием следует проводить при постоянной температуре (0—5 °C) и при оптимальном значении pH (около 5 для амилолитических ферментов). Осадок центрифугируется спустя 15—20 *мин* после добавления соли.

Диксон и Уэбб предложили номограмму (рис. 49) для расчета количества сульфата аммония, применяемого для осаждения ферментов.

Эта номограмма позволяет также вычислить количество сер-

нокислого аммония, которое следует добавить в ферментный раствор, имеющий определенное (исходное) насыщение, до требуемого насыщения.

Растворимость белков понижается с повышением концентрации нейтральных солей и в большинстве случаев это понижение следует эмпирическому уравнению Кона:

$$\lg S = \beta - K_S \mu,$$

где S — растворимость белка в растворе соли;
β — логарифм растворимости в растворителе (без электролитов);
K_S — константа, называемая константой высаливания;
μ — ионная сила раствора.

Если ионная сила раствора мала, то растворимость возрастает до определенного значения, но после достижения максимума наступает высаливание.

Повышение растворимости белков в растворе нейтральных электролитов слабых концентраций может быть объяснено образованием соединений между ионом электролита и белка.

Поглощение катионов из растворов соли может сообщить белку положительный заряд, а при поглощении анионов белок приобретает отрицательный заряд.

Ионы соли присоединяются к полярным группам белка (аминогруппе, карбоксильной, пептидной).

Осаждение белков (высаливание) обусловлено степенью замещения растворителя солью, т. е. уменьшением взаимодействия белка с растворителем (водой).

Таким образом, процесс высаливания представляет собой действие соли на воду, вызывающее уменьшение ее активности, т. е. уменьшение способности воды растворять белки.

Отметим, что зависимость растворимости белковых веществ от содержания нейтральных солей — явление весьма сложное. Нередко некоторые соли, взятые в определенных концентрациях, повышают растворимость белков, а при иных концентрациях вызывают уменьшение растворимости тех же белков.

Известно несколько теорий, объясняющих механизм высаливающего действия солей.

Дебай полагал, что ионы солей образуют электрическое поле, которое определенным образом ориентирует растворенные белковые молекулы, распределяющиеся в растворе таким образом, чтобы в участках, обладающих большей силой электрического поля, происходило возрастание диэлектрической постоянной по сравнению со средней диэлектрической постоянной раствора.

Если при растворении вещества происходит снижение диэлектрической постоянной раствора, то концентрация белка вблизи иона соли понижается и происходит процесс высаливания, который зависит от концентрации ионов.

Высаливание возрастает с увеличением концентрации ионов и зависит от валентности и размеров ионов. С увеличением валентности и уменьшением размеров ионов сила поля вблизи них возрастает.

Таким образом, теория Дебая объясняет высаливающее действие солей понижением диэлектрической постоянной раствора.

Сложность объяснения процесса высаливания заключается в том, что отдельные участки белковых молекул различно взаимодействуют с ионной атмосферой.

Константа высаливания зависит от природы соли. Так, K_S (при равенстве эквивалентов) имеет следующее значение: цитрат Na — 1,29, фосфат K — 1,15, сульфат Na — 1,08, сульфат NH_4 — 0,84, сульфат Mg — 0,62. Константа высаливания не зависит от концентрации водородных ионов, а высаливающее действие соли вблизи изоэлектрической точки белка усиливается и возрастает с увеличением молекулярного веса белка.

Несомненный интерес может представить осаждение белка из раствора методом вымораживания. Напомним, что эвтектическая точка соответствует равновесию между жидким раствором и двумя кристаллическими фазами эвтектического равновесия.

При полном замораживании гидрофильных золей частицы белка в замерзшем слое находятся между кристаллами льда, которые плотно их спрессовывают.

Сближение частиц белка приводит к проявлению ван-дер-ваальсовых сил притяжения, что и вызывает коагуляцию частиц.

Следует отметить, что увеличение количества электролитов способствует коагуляции методом вымораживания и уменьшает возможность перехода в раствор при оттаивании.

Добавление в белковый раствор соли вызывает частичное изменение третичной и четвертичной структуры молекул вследствие изменения электрокинетического потенциала и уменьшения степени гидратации белковых молекул, что приводит к их агрегации, степень которой различна для разных белков. На этом принципе, как указывалось выше, основывается фракционирование биополимеров.

Основной фактор высаливающего действия заключается во взаимодействии ионов солей с молекулой белка.

В экстракте ферментов или культуральной жидкости возможно взаимодействие белка с другими высокополимерными соединениями, образующийся при этом комплекс выпадает в осадок при других концентрациях электролита, чем индивидуальные белки, что также используется при фракционировании и очистке ферментных растворов.

В изоэлектрической точке раствора количество электролита (соли), находящегося в осадке белка, минимально.

Определенное взаимодействие электролитов (солей) с белком определяет условия получения кристаллических ферментов.

Ориентация цепей белковых молекул, необходимая для образования кристаллической структуры, часто возможна только при наличии определенных ионов.

ОСНОВЫ ПЕРЕГОНКИ СПИРТА[1]

Так как для осаждения ферментов применяются органические растворители, которые необходимо регенерировать, то остановимся на основных положениях их перегонки.

Процесс перегонки жидких смесей основан на том, что жидкости, входящие в состав смеси, обладают различной летучестью, т. е. при одной и той же температуре обладают различной упругостью паров.

Цель перегонки состоит в отделении летучих веществ от нелетучих или в разделении жидкостей различной летучести. Перегонка заключается в испарении жидкости и конденсации полученных при этом паров. Проще всего протекает перегонка однокомпонентной жидкости, т. е. состоящей из одного вещества. При нагревании такой жидкости упругость ее паров повышается, и, когда их давление становится равным давлению окружающей среды, жидкость закипает. Температура остается постоянной до полного испарения всей жидкости. Значительно сложнее проходит перегонка жидкости, состоящей из двух или нескольких компонентов, кипящих при разных температурах.

Испарением смеси жидкостей, кипящих при разной температуре, и последующей конденсацией полученных паров можно отобрать фракции, более богатые летучим компонентом. Этот метод, называемый простой перегонкой, широко используется в технике.

Сложной перегонкой (ректификацией) называют процесс многократной повторной перегонки, сопровождающийся частичным превращением паров в жидкость — конденсацией паров.

Ректификация — широко распространенный способ наиболее полного разделения смесей летучих жидкостей, частично или целиком растворимых одна в другой.

Для получения ректификованного спирта этот процесс проводят при давлении, несколько превышающем атмосферное, создаваемом за счет сопротивлений движению жидкости в колонне. Известны также аппараты, в которых процесс ректификации проходит при повышенном давлении или под вакуумом. Под ректификацией в технике понимают очистку спирта-сырца от примесей, в результате которой получают ректификованный спирт или ректификованный спирт высшей очистки.

Для разделения смеси нескольких веществ путем перегонки

---

[1] В данном разделе использованы материалы из книги Г. И. Фертмана и М. С. Шульмана «Физико-химические основы производства спирта». Пищепромиздат, 1960.

необходимо, чтобы состав пара отличался от состава жидкости, из которой он образовался.

Согласно первому закону Д. П. Коновалова, пар, находящийся в равновесии с раствором, всегда содержит в избыточном против жидкости количестве тот компонент, прибавление которого при неизменной температуре увеличивает общее давление пара.

Если при одной и той же температуре две жидкости имеют различную упругость пара, то это позволяет разделить их путем перегонки, получив отдельные продукты в результате конденсации паров, выделяющихся из перегонного аппарата.

С возрастанием содержания спирта в перегоняемой жидкости и выделяющихся из нее парах уменьшается коэффициент укрепления, который с повышением крепости жидкости, подлежащей перегонке, непрерывно уменьшается.

Путем повторной перегонки можно укреплять полученный погон, однако по достижении при нормальном давлении крепости 97,2 или 95,57% вес. дальнейшее укрепление дистиллята повторной перегонкой уже невозможно, так как состав выделяющихся при этом паров такой же, как и жидкости, из которой они образовались.

В данном случае мы имеем дело с нераздельно кипящей (азеотропной) смесью этилового спирта и воды (температура кипения при нормальном давлении 78,15° С), которая ведет себя как однородная жидкость, т. е. состав ее паров и жидкости одинаковы.

Азеотропная точка зависит от внешнего давления и в соответствии с законом Вревского перемещается с понижением давления (температуры) в сторону более высоких концентраций.

При перегонке водно-спиртового раствора упругость паров спирта при любой температуре значительно превышает упругость паров воды (табл. 28), поэтому содержание спирта в парах больше, чем в испаряемом водно-спиртовом растворе.

Таблица 28

Температура, °С	Упругость паров, *мм рт. ст.*		Температура, °С	Упругость паров, *мм рт. ст.*	
	спирта	воды		спирта	воды
0	12,24	4,57	70	540,9	233,31
10	23,77	9,14	80	811,8	354,87
20	44,00	17,36	90	1186,5	525,47
30	78,06	31,51	100	1692,3	760,00
40	133,42	54,87	110	2359,8	1075,37
50	219,82	91,98	120	2233	1491,28
60	350,2	148,89	130	4320	2030,28

Если в прямоугольной системе координат по оси абсцисс отложить содержание спирта в жидкости, а по оси ординат — содержание его в парах, то можно вычертить кривую, показывающую соотношение между содержанием спирта в жидкости и в парах, называемую кривой равновесия для смеси этиловый спирт — вода.

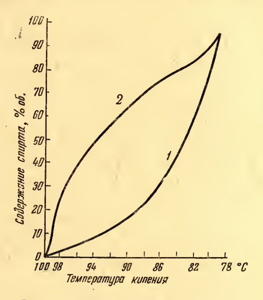


Рис. 50. Кривая равновесия смеси этиловый спирт — вода:
1 — в кипящей жидкости; 2 — в парах.

На рис. 50 приведена температура кипения различных водно-спиртовых смесей в зависимости от содержания компонентов в смеси (в молярных процентах).

Соотношения, существующие между содержанием спирта в водно-спиртовых смесях и в их парах, справедливы и для охлаждаемых в процессе дефлегмации паров (между жидкой фазой и несконденсировавшимися парами).

Физико-химические свойства водно-спиртовых растворов обусловлены взаимодействием между молекулами спирта и воды, приводящим к образованию непрочных соединений — гидратов. Данное положение впервые высказал Д. И. Менделеев.

За счет водородной связи этиловый спирт образует комплексы следующего вида:

$$\underset{\displaystyle R}{\overset{|}{\mathrm{O}}}\!-\!\mathrm{H}\;.\;.\;.\;\underset{\displaystyle R}{\overset{|}{\mathrm{O}}}\!-\!\mathrm{H}\;.\;.\;.\;\underset{\displaystyle R}{\overset{|}{\mathrm{O}}}\!-\!\mathrm{H}\;.\;.\;.\;\underset{\displaystyle R}{\overset{|}{\mathrm{O}}}\!-\!\mathrm{H}$$

При смешивании спирта и воды водородные связи между одинаковыми молекулами ослабевают, а упругость пара водно-спиртовой смеси вследствие этого больше, чем в идеальном растворе, подчиняющемся закону Рауля.

Одновременно с ослаблением водородных связей молекул воды и спирта могут образовываться новые водородные связи между молекулами воды и спирта.

Следовательно, в водно-спиртовом растворе происходит или ослабление водородных связей, или их дополнительное возникновение, что сказывается на зависимости максимумов физических констант от концентрации спирта.

Наличие в ферментном растворе некоторых электролитов в определенной концентрации или увеличение их содержания после упаривания культуральной жидкости или вытяжки может способствовать увеличению инактивирующего действия спирта, осаждающего ферменты, т. е. наблюдается ингибирование вследствие более резкого изменения белковой структуры от совместного действия присутствующих электролитов и добавленного спирта.

* *
*

Осаждение ферментов обусловлено физико-химической структурой белка, а также химической природой растворителя. Увеличение гибкости цепи полимера приводит к его лучшей растворимости. Плохим растворителем считается такой, молекулы которого взаимодействуют с небольшим числом активных групп растворенного белка.

Устойчивость раствора высокополимеров в полярных растворителях в значительной степени связана с сольватацией полярных групп. Раствор полимера образуется в том случае, если притяжение белка и воды значительно больше взаимного притяжения молекул полимера. Добавление органического растворителя к раствору белка вызывает уменьшение притяжения полярных групп фермента к молекулам воды, так как уменьшается количество молекул воды, присоединяющихся к полярным группам белка. Уменьшение притяжения активных групп фермента к молекулам воды обусловлено главным образом снижением диэлектрической постоянной среды.

Соли кальция способствуют уменьшению количества органического растворителя, расходуемого для осаждения ферментного комплекса, и улучшению качества ферментных осадков (препарата амилазы из гриба Asp. oryzae) вследствие образования агрегатов белковых молекул. Оптимальная концентрация органического растворителя, вызывающая осаждение различных ферментов, зависит от размеров молекул и их конформации.

Высаливание белков обусловлено ионной силой соли, а константа высаливания различна для каждого белка и применяемого электролита.

Глава VI

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УПАРИВАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ И СУШКИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ УПАРИВАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ

Основным фактором устойчивости белковых веществ является их гидратация, в которой участвуют как ионизированные, так и полярные группы белка. Первые из них ориентируют диполи воды в электрическом поле, а вторые — взаимодействуют с водой главным образом за счет водородных связей.

Гидратация вызывает изменение термодинамических свойств как растворенного вещества, так и воды.

Мы отмечали выше, что гидратный слой имеет диффузное строение и энергия связи обусловлена главным образом первым молекулярным слоем. Сорбционное связывание воды белком (гидратация) лежит в пределах 0,15—0,35 *г* воды на 1 *г* белка и приводит к уменьшению энтропии, т. е. процесс гидратации протекает с выделением тепла (экзотермический процесс), тогда как при растворении белка энтропия возрастает, т. е. процесс сопровождается поглощением тепла.

Приведем некоторые данные о связывании воды желатином (табл. 29).

Таблица 29

pH	Общее количество воды	Свободная вода	Связанная вода
	%		
5,3	87,0	62,8	24,2
4,2	86,4	60,25	26,2
3,0	87,1	59,50	27,6

Нагревание, изменение pH среды, вибрация и другие факторы вызывают изменение и распад водородных и мостичных связей, что непосредственно сказывается на пространственных изменениях, т. е. на конформации белковой молекулы. При денатурации белковой молекулы может разорваться до 25% связей.

Конформационные изменения молекулы белка предопределяют его физико-химические и биокаталитические свойства.

Денатурация белка может быть как обратимой, так и необратимой.

Ферменты являются наиболее лабильными белками. Незначительное изменение внутренней структуры ферментов приводит к резкому изменению их реакционной способности.

Ранее полагали, что при денатурации происходит расшатывание глобулы белка, приводящее к растягиванию молекулы, в результате чего гидрофобные участки белка, которые ранее были спрятаны внутри глобулы, освобождаются и оказываются на ее поверхности, что вызывает уменьшение растворимости. Кроме того, считали, что гидрофобизация поверхности белковой молекулы приводит к агрегированию полипептидных цепей по неполярным участкам.

Современные представления о структуре биополимеров позволяют утверждать, что денатурация может быть охарактеризована как необратимая конформация молекул белка, приводящая к изменению вторичной и третичной структуры, часто превращая макромолекулу белка в свернутый клубок.

Необходимо отметить, что способность к гидролизу до мономера значительно выше у белка, подвергнутого денатурации, по сравнению с нативным белком, имеющим более плотную конформацию.

Большинство ферментов весьма быстро и необратимо теряет активность при температуре кипения воды (при нормальных условиях).

Процесс денатурации является результатом столкновения части молекул белков под действием различных факторов; при этом избыток энергии поглощается определенной связью или несколькими связями молекулы белка.

При денатурации энтропия имеет значение 10—15 *ккал/(моль·°K)*.

При глубокой денатурации белка растворимость его снижается.

На скорость денатурации растворов белков оказывает влияние как температура, так и продолжительность нагревания.

В результате теплового или другого воздействия происходит также разрушение цистиновых связей белка, но основным фактором инактивации является изменение третичной структуры белковой молекулы.

Инактивация может наступить в результате разрыва одной S — S-связи и определенного количества водородных связей. При разрыве только цистиновых связей и сохранении водородных связей S — S-связи могут восстановиться и тем самым восстановится первоначальная структура белка. При одновременном разрушении цистиновых и водородных связей третичная структура белка нарушается.

Экспериментальные данные показывают, что ферментатив-

ной активностью обладает не вся молекула белка, а только ее определенная часть, и что уменьшение ферментативной активности не всегда следует за уменьшением растворимости белка, а чаще всего предшествует ему.

Многочисленными исследованиями установлено, что белок в растворенном состоянии денатурирует значительно быстрее, чем в состоянии геля и особенно ксерогеля.

Р. Сетлоу и Э. Поллард приводят следующие термодинамические данные Стерна о денатурации белка (табл. 30).

Таблица 30

Фермент	ΔH, *кал/моль*	ΔS, *кал/(моль·°K)*
В водном растворе		
Инсулин	35,600	23,8
Трипсин	40,200	44,7
Каталаза	50,500	81,0
Пепсин	55,600	113,0
Инвертаза	110,400	263,0
В сухом состоянии		
Уреаза	20,800	—22
Каталаза	21,500	—16
Трипсин	21,600	—24
Инвертаза	30,000	0
Химотрипсин	30,000	0

Упаривание ферментных растворов под вакуумом способствует сохранению ферментативной активности. Упаривание при 30 °С не вызывает инактивирования амилолитических ферментов; повышение температуры упаривания до 37 °С вызывает уменьшение активности растворов, подвергнутых предварительной очистке (табл. 31).

Л. Н. Аганесова установила, что максимальной температурой выпаривания ферментных растворов вытяжек является 37 °С. Культуральные жидкости, полученные при глубинном методе выращивания, а также тщательно очищенные вытяжки, полученные из плесневых грибов,

Таблица 31

Ферментный раствор	Температура кипения, °С	Амилолитическая активность, *ед/мл*		Степень инактивации, %
		До упаривания	после упаривания	
Исходная вытяжка гриба Asp. oryzae	30	14,0	92,0	Нет
	37—38	14,0	116,2	0,6
Диализованная вытяжка	30	9,8	72,0	Нет
	37—38	9,6	67,0	5,0
Вытяжка, очищенная уксуснокислым свинцом	30	8,9	84,5	4,8
	37—38	8,9	66,0	26,0
Вытяжка, очищенная аскангенелем	30	8,3	86,2	Нет
	37—38	8,3	75,0	12,9

выращенных поверхностным методом, упариваются без потерь ферментативной активности при температуре не выше 32° С.

Было установлено влияние температуры греющего агента и продолжительности теплового воздействия на устойчивость ферментов. Если, например, при температуре греющего агента до 45°С ферментативная активность не зависит от продолжительности выпаривания, то уже при 55°С это влияние проявляется довольно отчетливо.

Ферментативная активность культуральной жидкости плесневых грибов наиболее чувствительна к температуре греющего агента и продолжительности выпаривания.

Следует указать, что полное обезвоживание ферментного препарата даже при лиофильной сушке может привести иногда к изменению конформационной структуры белка, сказывающейся на заметном уменьшении ферментативной активности. Так, по данным Беленького, Полонской и Чамина, полное обезвоживание амилазы путем лиофильного высушивания приводит к полному ее инактивированию, а ферменты нуклеазного и протеолитического комплекса сохраняют свою активность.

С целью уменьшения инактивации ферментов высушивание их растворов следует проводить при значениях pH, лежащих за пределами изоэлектрической точки высушиваемого белка, т. е. при условиях, обеспечивающих максимальную устойчивость растворов.

ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ

Выпаривание ферментных экстрактов сопровождается заметным повышением их вязкости и уменьшением поверхностного натяжения.

Немаловажное значение при исследовании физико-химических свойств ферментов имеет поверхностное натяжение их растворов.

Молекула, находящаяся в поверхностном слое, испытывает притяжение со стороны нижележащих молекул этого же слоя. Такое положение молекул в поверхностном слое обусловливает наличие особого запаса энергии, называемой поверхностной. Жидкость всегда стремится уменьшить свою поверхность и, следовательно, на увеличение поверхности жидкости требуется затрата некоторой работы.

Работа, необходимая для обратимого увеличения поверхности раздела на 1 $см^2$ при постоянных температуре и давлении, называется поверхностной энергией.

Поверхностное натяжение жидкости уменьшается при повышении температуры. Так, поверхностное натяжение для воды при различной температуре имеет следующие значения.

Температура, °С	10	15	18	20	25	30	40	50	60
Поверхностное натяжение, σ	74,22	73,49	73,05	72,75	71,97	71,18	69,56	67,91	66,18

Поверхностное натяжение на границе раздела двух жидких фаз (при равновесии) равно, как правило, разности поверхностного натяжения этих фаз.

Растворяющиеся в жидкости вещества способны вызывать повышение или понижение ее поверхностного натяжения. Вещества, которые уменьшают поверхностное натяжение жидкости, называются поверхностно-активными. К поверхностно-активным веществам относят белки, органические кислоты и их соли, спирты, некоторые масла, органические красители и др.

Траубе установил, что поверхностная активность веществ определенного гомологического ряда возрастает в геометрической прогрессии от одного члена ряда к другому. Так, для понижения поверхностного натяжения воды на 14% требуется добавить 1,38% муравьиной кислоты, а *н*-нониловая кислота способна вызвать такое же уменьшение при концентрации всего 0,00014%, т. е. почти в 10 000 раз меньшей.

Изменение поверхностной активности зависит от характера взаимодействия активных групп растворяемых веществ с растворителем при значительной длине углеводородной цепи. Активные полярные группы располагаются на поверхности жидкости в виде определенно ориентированного частокола, причем гидрофильные группы всегда обращены к поверхности воды, а гидрофобные — наружу.

К гидрофильным полярным группам относятся: — $COOH$,— CHO, CO, NH_2, SH.

К гидрофобным группам относятся углеводородные группы: CH_2, CH_3, C_2H_5, $C_n H_{2n+1}$.

При ферментации, а также при вакуум-выпаривании ферментных экстрактов и культуральной жидкости весьма часто наблюдается пенообразование, обусловленное наличием в водном растворе газовой фазы и поверхностно-активных веществ (белков) — пенообразователей и стабилизаторов пен.

Так как поверхностная активность больше всего проявляется на границе фаз вода — газ, то пенообразователи активнее действуют в водных растворах.

П. А. Ребиндер разделяет пенообразователи на две группы: слабые и сильные. Слабые пенообразователи — это поверхностно-активные вещества, уменьшающие поверхностное натяжение на границе раздела фаз и не образующие структуры как в растворе, так и в адсорбционных слоях. К ним относятся также и

поверхностно-инактивные электролиты, которые могут создавать локальные разности поверхностных натяжений, что также может вызвать переброс раствора при энергичном кипении.

К сильным пенообразователям относятся гидрофильные высокомолекулярные соединения (белковые вещества, некоторые

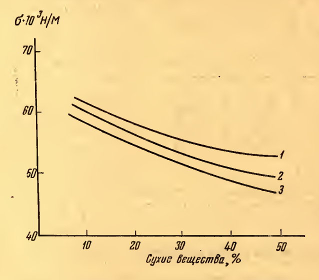


Рис. 51. Влияние температуры на поверхностное натяжение растворов ферментов (по данным Л. Н. Аганесовой):
1 — 20 °С, 2 — 30 °С, 3 — 40 °С.

гликозиды), способные образовывать в адсорбционных слоях прочные пространственные структуры, устойчивость которых возрастает с увеличением концентрации пенообразователя, а также некоторые вещества (так называемые загустители), вызывающие заметное повышение структурной вязкости в поверхностных пленках.

Пенообразование — весьма нежелательное явление для многих отраслей промышленности, так как оно нарушает технологический процесс.

Для уменьшения или ликвидации пен применяют так называемые пеногасители, представляющие собой поверхностно-активные вещества, обладающие малой растворимостью в воде, но способные сразу растекаться по ее поверхности мономолекулярным слоем, вытесняя при этом пенообразователь и разрушая тем самым структуру пены.

В качестве пеногасителя применяют олеиновую кислоту, октиловый спирт, полиамиды жирных кислот, пропиленгликоль, силиконы и др.

Установлено, что ферментные растворы, полученные из различных культур плесневых грибов, обладают разным поверхностным натяжением. Так, при 6%-ном содержании сухих веществ в вытяжке гриба Asp. oryzae поверхностное натяжение при 20 °C равно 62,83, а из гриба Asp niger 63,31, что может быть объяснено различным содержанием поверхностно-активных веществ, т. е. можно предположить, что вытяжки, полученные из гриба Asp. oryzae, содержат их больше, чем вытяжки Asp. niger.

Таблица 32

Содержание сухих веществ, %	Поверхностное натяжение при 20 °C, *дин/см*	
	Asp. oryzae	Asp. niger
6	62,83	65,80
10	61,10	59,13
20	58,64	56,67
30	55,68	54,45
40	53,73	52,73
50	52,81	51,73

Повышение температуры приводит к уменьшению поверхностного натяжения ферментных растворов, что проявляется и при сравнительно небольшом содержании сухих веществ в ферментных растворах (рис. 51).

РАСПЫЛИТЕЛЬНАЯ СУШКА ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ

Для уменьшения тепловой инактивации термолабильных продуктов при выпаривании их используют пленочные вакуум-выпарные аппараты, в которых раствор упаривается в виде пленки, образующейся при стекании раствора на поверхность аппарата, согреваемую теплоносителем.

Внутри вакуум-выпарных аппаратов поддерживается остаточное давление 20—50 *мм рт. ст.*, что дает возможность получить на поверхности испарения температуру 40—44 °C, а температура прилегающего к ней слоя близка к температуре теплоносителя (100°C).

В последнее время в ряде отраслей промышленности используется сублимационный метод сушки, т. е. удаление воды при глубоком вакууме и низкой температуре (—50°C) раствора или влажного продукта. При этом методе сушки вода переходит из твердого агрегатного состояния в парообразное, минуя жидкое состояние.

Сублимационная установка состоит из сушильной камеры (сублиматора), охлаждаемого конденсатора и вакуум-насоса, которые соединены в замкнутую вакуумируемую систему.

Процесс сублимационной сушки состоит из нескольких этапов. Вначале происходит удаление замороженной части влаги в результате перехода ее из твердого состояния в парообразное, т. е. непосредственно сублимационная сушка, которая проте-

кает при глубоком вакууме (10^{-2}—10^{-3} *мм рт. ст.*). Если в сублиматор помещен влажный продукт, то при вакуумировании происходит испарение влаги, вызывающее охлаждение и последующее замораживание продукта.

В первой стадии сушки происходит наиболее интенсивное испарение влаги из твердого состояния, что вызывает дополнительное понижение температуры замороженного раствора.

Следующий этап характеризуется частичным удалением связанной воды (иммобилизованной). Эта стадия протекает значительно медленнее первой и требует слабого подогрева сублимируемого раствора, который находится в замороженном состоянии.

Для полного удаления связанной воды проводят дополнительное подогревание до температуры 22—25°С или несколько выше (в зависимости от термолабильности вещества).

Таким образом, постепенное подведение тепла приводит к углублению зоны сублимации.

Режим и скорость сублимации зависит как от температуры, степени разрежения системы, так и от лабильности сублимируемого продукта.

Собственно процесс сублимации заканчивается, когда высушиваемый продукт приобретает положительную температуру.

Ферментативная активность ферментных препаратов, получаемых в результате сублимационной сушки растворов, зависит от режима сушки, который может влиять на изменение концентрации солей (например солей кальция) сублимируемых растворов.

Продукты, получаемые после сублимационной сушки, должны обладать влажностью от 2 до 5%. Более низкое содержание влаги может вызвать уменьшение стабильности при длительном хранении.

Большое промышленное значение приобрел распылительный метод сушки, заключающийся в том, что раствор с помощью специального диска, вращающегося со скоростью до 18 000 *об/мин,* или форсуночным распылителем диспергируется в потоке горячего теплоносителя на капли диаметром 10—100 *мкм.*

Так как процесс сушки в распылительных сушилках длится всего 1—2 *сек* и диспергированные частицы раствора высушиваются при невысокой температуре (температура теплоносителя на входе 120—180°С, на выходе 60—80°С), этот метод обезвоживания широко применяется для термолабильных веществ.

Метод распылительной сушки позволяет получить продукт, обладающий хорошей растворимостью.

Производительность распылительных сушилок составляет до 8 *т* испаренной влаги в час.

Калунянц и Ваганова установили, что если в диффузионных

экстрактах содержится более 5% редуцирующих веществ от общего содержания сухих веществ, то сушка распылением весьма затруднительна, так как частицы слипаются и возможна значительная инактивация ферментов.

Для снижения содержания редуцирующих веществ в сухих веществах вытяжки в экстракт перед высушиванием вносят инертное вещество, например, хлористый натрий (при высушивании вытяжки гриба Asp. oryzae) или лактозы (при высушивании раствора Asp. niger). Оптимальная доза хлористого натрия 50% от концентрации сухих веществ, а лактозы — до 60%.

При регулировании температуры теплоносителя (на входе 140° С, а на выходе 95—100° С) можно получать из вытяжки Asp. oryzae сухие препараты, обладающие только декстринолитической активностью.

При оптимальном режиме распылительного высушивания вытяжки Asp. oryzae (115—130° С на входе и 50—60° С на выходе) потери амилолитической активности составляют до 40%, мальтазная и декстринолитическая активности при высушивании не изменяются. Установлено, что при высушивании распылением экстрактов, полученных из поверхностных культур Asp. niger с добавлением 50—60% лактозы, общие потери составляют 29%.

Попытаемся объяснить действие некоторых солей и лактозы на уменьшение инактивации ферментов при вакуум-выпаривании и высушивании методом распыления.

Известно, что некоторые электролиты повышают устойчивость белков. Повышение вязкости раствора также способствует снижению лабильности белков, так как при этом затрудняется развертывание пептидных цепей. Добавляемые в раствор белка нейтральные электролиты создают мостичные связи между белковыми молекулами, что также способствует повышению их устойчивости.

Защитное действие сахаров, добавляемых в растворы белков, может быть объяснено взаимодействием их полярных (гидроксильных) групп с полярными группами белковых молекул, что приводит к снижению возможности взаимодействия сегментов белковых молекул и уменьшению сольватации.

Исследованиями Цыперовича установлена возможность стабилизации протеолитических ферментов смесью продуктов распада белка. Показано, что низкомолекулярные пептиды, образовавшиеся в результате ферментативного гидролиза некоторых белков (яичного альбумина, желатина и др.), а также отдельные аминокислоты (фенилаланин, лизин, изолейцин) являются стабилизаторами пепсина и трипсина.

Стабилизирующее действие аминокислот или низкомолекулярных пептидов объясняется блокированием части активного центра молекул протеиназ.

Уменьшение связи молекул белка с растворителем способствует стабилизации, так как наибольшая устойчивость белковой молекулы характеризуется ее наименьшей сольватацией. В области наименьшей сольватации можно предположить наличие наибольшего количества силовых мостиков.

Цыперович указывает, что повышение устойчивости глобул, т. е. торможение денатурации, вызывают электролиты (соли), которые оказывают высаливающее действие на белок.

Таким образом, добавление электролитов ($NaCl$) уменьшает гидратацию белковых молекул и способствует сжатию диффузного электрического слоя (уменьшение толщины диффузионного слоя, но увеличение плотности заряда), что приводит к большей стабильности глобул.

На устойчивость белка в растворе, помимо электролитов, оказывает влияние, как известно, концентрация водородных ионов.

12 СУШКА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В настоящее время общепринята следующая классификация форм связи влаги с материалом (по П. А. Ребиндеру):

1) химическая — наиболее прочная связь влаги с материалом. Удаление ее происходит при химическом взаимодействии или интенсивной тепловой обработке (прокаливании);

2) физико-химическая — удержание влаги силовым полем внешней и внутренней поверхностью вещества (адсорбционно связанная влага), а также осмотическое удержание влаги, как результат набухания полимера.

За счет физико-химической связи удерживается влага, заполняющая макрокапилляры, средний радиус которых больше 10^{-5} *см*, и микрокапилляры радиусом меньше 10^{-5} *см*.

Необходимость разделения на макро- и микропоры вызвана определенными закономерностями капиллярных явлений, например, образования сферической формы капли в результате поверхностного натяжения, наличия границы раздела между стенкой капилляра, водой и воздухом.

Механизм удаления влаги из различных капиллярно-коллоидных веществ обусловлен природой форм связи.

Адсорбционно связанная вода удаляется путем превращения ее в пар, который перемещается внутри высушиваемого материала.

Капиллярная влага может перемещаться (в зависимости от режима сушки) как в виде жидкости за счет диффузии через стенки и капиллярных сил, так и в виде пара.

Следует указать, что парциальное давление пара над поверхностью высушиваемого материала меньше, чем при испарении воды со свободной поверхности. Это аналогично пару над

раствором, упругость которого меньше упругости над поверхностью растворителя, что обусловливает наличие температурной депрессии (температура кипения раствора выше, чем чистого растворителя).

Укажем, что максимальная влажность, которую может иметь материал за счет сорбции пара при 100%-ной относительной влажности окружающей среды, называется гигроскопической влажностью. С увеличением гигроскопичности увеличивается влажность материала и больше поглощается влаги из воздуха при хранении продукта.

Перенос тепла в материале непосредственно связан с переносом влаги, а также конвекцией через поры с находящимися там паром и жидкостью.

Белки обладают значительно меньшей теплопроводностью, чем минеральные продукты.

В процессе сушки теплопроводность материала уменьшается вследствие того, что в поры вместо воды входит воздух, теплопроводность которого значительно меньше теплопроводности жидкости.

Скорость нагрева или охлаждения материала пропорциональна коэффициенту теплопроводности.

С. П. Колосков определил теплопроводность пшеничных отрубей и культур плесневых грибов при различной температуре и влажности.

Сухие пшеничные отруби обладают теплопроводностью 0,0515 *ккал/(м·ч·град)*, при 20%-ной влажности — 0,0495, а при влажности 55%—0,096 *ккал/(м·ч·град)*. Весьма близка к этим значениям теплопроводность культур плесневых грибов. С повышением температуры теплопроводность возрастает.

Исследованиями (Войнарский) установлено, что высушивание ферментного препарата, полученного в результате осаждения этиловым спиртом из вытяжки гриба Asp. oryzae, приводит к заметной инактивации амилолитической активности, достигающей 33% к концу вакуум-сушки при 30°С.

Добавление перед сушкой ферментного осадка крахмала может почти полностью исключить инактивирование амилолитических ферментов (табл. 33).

Из приведенных данных следует, что крахмал является хорошим стабилизатором амилазы при высушивании ферментного осадка в вакууме при 30°С. При более высокой температуре высушивания (40°С) добавление крахмала не дает желаемого эффекта.

Аналогичные результаты были получены при высушивании препарата Asp. awamori. Амилолитическая активность его без добавления крахмала уменьшалась в 2,5 раза по сравнению с препаратом, содержавшим 30% крахмала.

Следовательно, добавление крахмала способствует значи-

Таблица 33

Добавлено крахмала в препарат, %	Активность (АС в %) при длительности сушки, *мин*				
	10	20	40	60	120
Исходный	96	92	82	70	67
10	—	93	83	82	79
20	—	—	—	96	95
30	—	—	—	98	98

тельному уменьшению тепловой инактивации амилолитических ферментных препаратов.

После высушивания в вакуум-сушильном шкафу ферментные препараты обладают влажностью 10—11%.

Протеолитические ферментные препараты более стабильны при высушивании, чем амилолитические, и их можно сушить в вакууме при 35—40° С.

Калунянц и Ваганова установили, что пектолитический ферментный препарат следует высушивать в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 40°С. Общие потери активности при высушивании составляют 6—8%.

Скорость вакуум-сушки зависит от остаточного давления в шкафу, толщины слоя высушиваемого препарата, от степени его измельчения и от интенсивности подвода теплового агента и степени заполнения вакуум-сушильных аппаратов.

Интенсивность процесса вакуум-сушки ферментных препаратов зависит также от их удельной теплоемкости. Скуратов экспериментально установил, что теплоемкость крахмала удовлетворяет уравнению $C=0{,}290+0{,}0071\ y$, где y — процент влаги.

Исследования теплоемкости разваренного сырья различной концентрации показали, что среднее значение теплоемкости удовлетворяет уравнению Скуратова. Так, теплоемкость сухого ячменя равна 0,290, овса 0,295, ржи 0,288. После разваривания ржи (14,1% сухих веществ) теплоемкость ее составляет 0,89.

С. П. Колосков определил удельные теплоемкости культур плесневых грибов и пшеничных отрубей, предложив уравнения, связывающие теплоемкость с влажностью и температурой. Так, для пшеничных отрубей значение удельной теплоемкости выражается уравнением

$$C = 0{,}286 + 0{,}0017t + 0{,}00175w + 10\,(0{,}03w - 2{,}5)\ \textit{ккал/(кг·град)}.$$

Вычисление теплоемкости ферментных препаратов в зависимости от их влажности можно вести по уравнению Скуратова.

Так, осадок ферментного препарата влажностью $y=40\%$ обладает удельной теплоемкостью

$$C = 0{,}290 + 0{,}0071y \cdot 40 = 0{,}574.$$

Известно, что в результате обезвоживания образуется пар, давление которого меньше, чем при его оводнении при том же содержании влаги. Необратимость процесса сорбции и десорбции влаги при оводнении и сушке получило название гистерезиса сорбции. На это явление впервые обратил внимание Раковский, исследовавший сорбцию и десорбцию воды крахмалом. На рис. 52 представлена кинетика этого процесса.

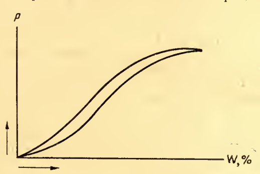


Рис. 52. Сорбция и десорбция воды крахмалом.

Сушка материала начинается при создании разности давления паров над поверхностью высушиваемого материала и окружающей среды.

При нагреве влажного материала температура его повышается до определенной величины, оставаясь затем постоянной до тех пор, пока испарение влаги с его поверхности не закончится. Скорость удаления влаги в этот период зависит от условий подвода тепла к материалу и отвода паров влаги с поверхности.

Прежде всего происходит удаление так называемой внешней влаги, под которой понимают влажность материала выше гигроскопической точки.

Первый период сушки, исключая период нагрева материала, характеризуется неизменной скоростью и температурой материала и может быть интенсифицирован подводом тепла.

В дальнейшем интенсивность миграции влаги уменьшается, так как зона испарения с поверхности материала перемещается в его средние слои. При этом резко повышается температура поверхности вещества. Период уменьшения скорости сушки и повышения температуры материала называется вторым периодом сушки.

Для термочувствительных продуктов интенсифицировать процесс следует в первый период сушки.

На рис. 53 представлена изотерма сорбции водяных паров ферментным препаратом Asp. oryzae в зависимости от относительной влажности воздуха.

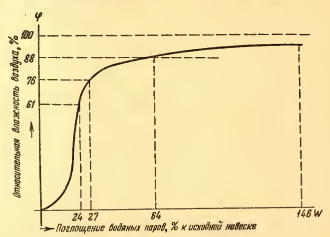


Рис. 53. Изотерма сорбции водяных паров ферментным препаратом.

Проведенными исследованиями установлено, что длительность хранения ферментных препаратов зависит главным образом от степени их влажности.



Рис. 54. Схема классификации влаги, удаляемой при сушке.

Приведем схему классификации влаги, удаляемой при сушке (по Гинзбургу).

Как следует из рис. 54, область обычной сушки представляет собой разность между влажностью материала (влажное состояние) и гигроскопической влажностью (максимальная

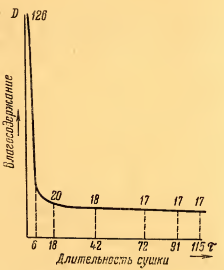


Рис. 55. Кинетика сушки ферментных препаратов.

влажность за счет сорбции пара из окружающей среды при 100%-ной относительной влажности воздуха).

Кинетика сушки ферментных препаратов (зависимость влагосодержания от длительности сушки) представлена на рис. 55.

Под влагосодержанием понимают содержание жидкости, отнесенное к единице массы сухой части материала.

Скорость сушки, как указывает А. В. Лыков, определяется не только скоростью передачи тепла, но и скоростью перемещения влаги внутри материала.

В первый момент сушки поверхностные слои быстро обезвоживаются вследствие испарения под влиянием градиента влажности, что вызывает увеличение первоначальной влажности в центральных слоях. Затем влага переходит от центральных слоев к поверхности. Это явление, а также перемещение влаги, исключающее диффузию жидкости и пара различных форм связи влаги, в том числе и капиллярное перемещение жидкости, называют влагопроводностью, которая учитывается при отсутствии градиента температуры.

Количество влаги, перемещающейся под влиянием градиента температуры, называется термовлагопроводностью.

В процессе сушки нагретым воздухом температурный градиент внутри материала невелик и здесь действует главным образом закон влагопроводности.

При сушке материала воздухом удаление влаги происходит до равновесной влажности. Влажность на поверхности материала близка к равновесной.

* *
*

На скорость процесса денатурации растворов белков влияет как температура, так и продолжительность нагревания.

Основной причиной инактивации ферментов является изменение третичной структуры белковых молекул. Упаривание ферментных растворов под вакуумом (при $t=37°C$) способствует сохранению ферментативной активности. Применение при упаривании пеногасителей основано на их способности вытеснять пенообразователь из поверхностного слоя и разрушать тем самым структуру пены. Добавление некоторых солей повышает устойчивость белков при высушивании их растворов, что объясняется, по-видимому, созданием мостичных связей между белковыми молекулами, препятствующих развертыванию пептидных цепей.

На основе представленного механизма удаления влаги из капиллярно-коллоидных веществ рассмотрен процесс высушивания ферментных препаратов. Показано, что крахмал является хорошим стабилизатором амилазы при высушивании ферментного осадка в вакууме при 30°C. Интенсивность процесса вакуум-сушки ферментных препаратов зависит и от их удельной теплоемкости. Интенсификация процесса сушки термолабильных веществ подводом тепла возможна только в первый период сушки, характеризующийся неизменной скоростью и температурой материала.

Глава VII

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ХРАНЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Растворы ферментов нельзя длительно хранить при комнатной температуре, так как они неустойчивы и быстро денатурируют. Кроме того, как всякие белковые растворы, они представляют собой хорошую питательную среду для развития бактерий. С повышением концентрации белка (фермента) стабильность ферментов возрастает.

Некоторые ферменты более устойчивы при комнатной температуре, если они находятся в виде суспензий или в растворе сульфата аммония, концентрация которого близка к насыщению.

После вакуум-выпаривания и последующего вакуум-высушивания (или сублимации), а также после осаждения экстрактов органическими растворителями и высушивания осадка в вакууме получается растворимый порошок ферментов, который долгое время (более двух лет) сохраняет первоначальную активность.

Известно, что скорость ферментативных реакций можно значительно уменьшить небольшой добавкой некоторых химических веществ, которые могут отравлять ферменты, или блокировать их функциональные группы. Иногда используют добавку таких веществ для полного прекращения действия ферментов.

Уменьшение скорости ферментативной реакции называется, как известно, торможением, или ингибированием, ферментов. Необходимо подчеркнуть, что в данном случае речь идет не о снижении ферментативной активности с помощью любого приема, вызывающего денатурацию белка (повышение температуры, действие кислот, оснований и др.), которое называется неспецифическим подавлением активности фермента.

Для объяснения процесса взаимодействия фермента с некоторыми веществами-ингибиторами остановимся на определении ингибирования.

Под ингибированием ферментов обычно понимают взаимодействие небольших добавок веществ с активными центрами молекулы фермента.

При изучении химической структуры ферментов наряду с другими методами используется так называемый ингибиторный

анализ, который позволяет определить химические функциональные группы ферментов.

Ингибиторы могут взаимодействовать с ферментами обратимо и необратимо. Если ингибиторы блокируют функциональные группы активного центра, вступая во взаимодействие с субстратом, то их называют конкурентными, а если ингибирование является результатом взаимодействия ингибиторов с другими группами ферментов, то такие ингибиторы называются неконкурентными. При неконкурентном ингибировании ингибитор может взаимодействовать не только с ферментом, но и с фермент-субстратным комплексом. Не исключено также одновременное конкурентное и неконкурентное ингибирование ферментов. Вопросы ингибирования ферментов изложены Уэббом, а также Яковлевым.

СТАБИЛИЗАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СИРОПОВ

Стабилизация сиропов ферментов, полученных путем вакуум-выпаривания экстрактов культур плесневых грибов или культуральной жидкости, путем добавок казеина или крахмала не повышала их устойчивости. Так, по данным Т. П. Демчук, после 2 месяцев хранения амилолитическая активность сиропа (pH 6), хранившегося при 4° С, упала на 10%, а с добавлением казеина за этот же срок — на 14%. Протеолитическая активность уменьшилась за это время на 6%.

Через 6 месяцев хранения ферментативная активность уменьшилась на 20%.

Установлено также, что сиропы, содержащие амилолитические ферменты, сохраняют свою активность в течение 12 месяцев, если их pH довести с 6,0—6,2 до 7,0. При pH 5,6 амилолитическая активность уменьшается за 12 месяцев хранения на 20%, при pH 5,0 — на 25%.

Сиропы протеолитических ферментов при температуре 4° С и pH 5,6 уменьшили активность всего на 10%.

Таким образом, установлено, что амилолитические ферменты обладают меньшей стабильностью по сравнению с протеолитическими.

Так, при 45% концентрации сухих веществ первоначальная протеолитическая активность сохранилась в течение 10 месяцев, а амилолитическая за это время упала на 25%.

Добавление к сиропу ферментов Asp. oryzae некоторых электролитов (NaCl) практически не изменяло их стабильности.

Большая стабильность сиропов даже без добавления электролитов наблюдалась при pH 7,0. Это было также подтверждено при исследовании процесса хранения после разбавления 70%-ного сиропа водой и 30%-ного раствора хлористого нат-

рия до концентрации 55%. Ферментативная активность обоих растворов в процессе хранения изменялась одинаково.

Повышение стабильности сиропа достигается как снижением температуры хранения, так и главным образом повышением концентрации в нем сухих веществ.

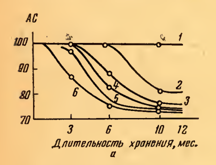


Рис. 56. Измеиеиие активиости сиропа амилолитических фермеитов в процессе хранения:

а — храненне при температуре 4—6 °С: *1* — содержание сухих веществ 70, 65 и 60%, *2* — то же 55%, *3* — 50%, *4* — 45%, *5* — 40%, *6* — 30%;
б — храненне при температуре 20—25 °С: *1* — содержанне сухих веществ в сиропе 70%, *2* — то же 65%, *3* — 60%, *4* — 55%, *5* — 50%, *6* — 45%, *7* — 40%, *8* — 30%.

Из приведенных данных (рис. 56) следует, что если концентрация сиропа лежит в пределах 60—70%, то амилолитическая активность сохраняется при 4—6°С в течение 12 месяцев. При уменьшении концентрации сиропа до 55% первоначальная амилолитическая активность сохраняется в течение 6 месяцев. Снижение концентрации сиропа до 45% позволяет сохранить исходную ферментативную активность в течение 3 месяцев. Дальнейшее снижение концентрации сиропа вызывает уменьшение стабильности амилолитических ферментов.

Повышение температуры хранения до 20—25°С резко уменьшает ферментативную активность сиропов.

Проведенными исследованиями установлено, что снижение температуры хранения с 4 до —28 °С практически не влияет на изменение амилолитической и протеолитической активности.

Увеличение стабильности с повышением концентрации сиропа обусловлено тем, что в более концентрированных растворах одинаково уменьшается диссоциирующая способность аминной и карбоксильной групп белка, чему способствует также высокая вязкость сиропов больших концентраций.

Уменьшению диссоциирующей способности функциональных групп белка и возрастанию вязкости сиропов способствует также понижение температуры.

Исследованием кинетики сорбции водяных паров исходных ферментных препаратов и препаратов с различными наполнителями (Войнарский, Кувикова, Шульман) установлено, что крахмал и лактоза заметно замедляют скорость поглощения ферментными препаратами водяных паров (рис. 57).

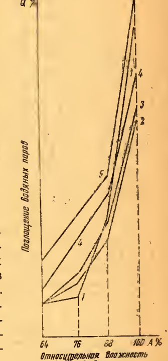


Рис. 57. Кинетика сорбции водяных паров ферментными препаратами с различными наполнителями:

1 — исходный препарат, 2 — препарат с крахмалом, 3 — с лактозой, 4 — с KCl, 5 — с NaCl.

Хлористый калий и хлористый натрий заметно повышают скорость сорбции водяных паров и, следовательно, способствуют снижению ферментативной активности в процессе хранения препарата.

С увеличением содержания хлористого натрия увеличивается скорость поглощения водяных паров ферментным препаратом. С повышением влажности ферментных препаратов ферментативная активность их постепенно уменьшается. Это доказывает, что ферментные препараты необходимо хранить в паронепроницаемой таре.

Стандартизация и стабилизация ферментных препаратов приобретают большое значение как при производстве, так и особенно при применении ферментов в различных отраслях промышленности.

Стандартизация ферментных препаратов, т. е. получение препаратов, обладающих определенной активностью, является необходимым условием их применения в народном хозяйстве.

Наполнитель, используемый для стандартизации препаратов ферментов, не должен необратимо ингибировать ферменты. Весьма желательно, чтобы наполнитель обладал также свойством стабилизатора ферментов.

Установлено, что после 30 *мин* смешивания в шаровой мельнице предварительно измельченного препарата и наполнителя (крахмал, хлористый натрий) достигается определенная ферментативная активность препарата.

Необходимо указать, что перед смешиванием препарат и наполнитель должны обладать влажностью не более 10—12%.

Количество наполнителя, необходимое для стандартизации, рассчитывается по формуле

$$S = \frac{ab}{C} - b,$$

где S — количество наполнителя, необходимое для доведения активности полученного препарата до стандарта, *кг*;
a — активность полученного исходного препарата, *кг*;
b — количество полученного исходного препарата, *кг*;
C — стандартная активность препарата, *ед/г*.

Установлено, что стандартизация препарата амилазы, полученного из экстракта гриба Asp. oryzae осаждением этиловым спиртом (вторая фракция), трехзамещенным фосфорнокислым аммонием или смесью хлористого натрия с фосфорнокислым аммонием (в равных соотношениях), вызывает уменьшение амилолитической активности на 25% сразу же после смешения препарата с наполнителями. Дальнейшее хранение в течение 6 месяцев не изменяет активности препарата.

При стандартизации препарата амилазы сернокислым аммонием амилолитическая активность уменьшается на 25%, а через 10 дней хранения — на 40%, не изменяясь в дальнейшем в течение 6 месяцев.

Стандартизация препарата хлористым натрием и крахмалом в равных соотношениях или только крахмалом позволяет хранить препарат без потери активности не менее двух лет.

Из данных, приведенных на рис. 58, видно, что стандартизация препарата Asp. oryzae крахмалом способствует длительному сохранению ферментативной активности, т. е. крахмал оказывает стабилизирующее действие на амилолитические ферменты.

Вполне возможно, что стабилизация крахмалом объясняется присутствием в молекуле амилазы значительной части углеводной фракции.

В некоторых случаях стандартизация ферментного препарата может быть достигнута путем смешения препарата, обладающего большей, чем стандартная, активностью, с препаратом более низкой активности.

В таком случае смешение до стандартной активности рассчитывается по уравнению

$$\frac{1A + xB}{1 + x} = C$$

где 1 — 1 часть препарата, обладающего активностью, больше стандартной;
A — ферментативная активность препарата выше стандартной;
B — ферментативная активность препарата ниже стандартной;

C — стандартная активность ферментного препарата;
x — число частей препарата, обладающего активностью меньше стандартной (необходимое для смешения с препаратом, имеющим активность больше стандартной).



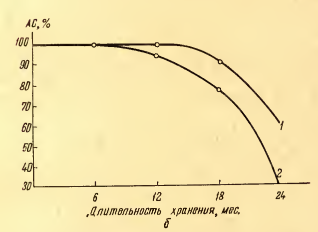


Рис. 58. Влияние продолжительности хранения на активность ферментных препаратов Asp. oryzae с наполнителями:

а — комплексный препарат: *1* — стандартизованный крахмалом, *2* — исходный препарат, *3* — препарат, стандартизованный NaCl;
б — амилазная фракция: *1* — исходная, *2* — очищенная бентонитом.

Например, АС одного препарата 600 *ед/г*, другого 300 *ед/г*, а требуется стандартная активность 400 *ед/г*. По приведенному выше уравнению получаем

$$\frac{1 \cdot 600 + x \cdot 300}{1 + x} = 400,$$

откуда $x=2$, т. е. на 1 часть препарата, обладающего активностью 600 *ед/г*, следует взять 2 части препарата с активностью 300 *ед/г*.

Таблица 34

Белок	Удельный объем, $см^3/г$	Плотность, $г/см^3$
Рибонуклеаза . .	0,709	1,41
Казеин	0,728	1,37
Инсулин	0,735	1,35
Яичный альбумин .	0,745	1,34
Желатин	0,682	1,46

При найденном соотношении препаратов указанной активности получаем стандартную активность 400 ед. АС/г.

Удельный вес (плотность) ферментных препаратов зависит от степени их очистки и лежит в пределах 1,35—1,50 $г/см^3$.

Размер частиц ферментного препарата 10—100 *мкм*, в основном преобладают частицы 40—75 *мкм*.

Ферментные препараты и наполнитель можно измельчать на шаровой мельнице с оптимальным числом оборотов $n=\frac{38}{\sqrt{D}}$, где D — диаметр мельницы (в *м*).

Исследования препарата пектиназы, стандартизованного различными наполнителями, показали, что препарат, стандартизованный крахмалом или хлористым натрием, не изменял первоначальной активности в течение 18 месяцев хранения при температуре до 30°С.

Для винодельческой промышленности представляет наибольший интерес применение диатомита в качестве наполнителей для препарата пектиназы.

Опыты хранения препаратов, стандартизованных желатином, диатомитом и бентонитом, показали резкое падение пектолитической активности, что обусловлено сорбцией пектиназы указанными наполнителями.

Несмотря на то что для смешения применялись ферментный препарат и наполнитель влажностью до 12%, происходила заметная хемосорбция пектиназы бентонитом, диатомитом и желатином. После одного месяца хранения сорбция пектиназы прекращается и пектолитическая активность препарата не изменялась в течение последующих 11 месяцев хранения.

Ферментативная активность препаратов, стандартизованных бентонитом, через один месяц хранения уменьшается на 72%. Дальнейшее хранение не влияет на пектолитическую активность.

Препарат, стандартизованный желатином, сразу при смешении терял активность на 14%, через месяц на 80%, а после 3 месяцев — на 86%.

После смешения препарата с диатомитом пектолитическая

активность уменьшалась на 13%, а после 20 дней хранения до 81%.

Нами установлена возможность десорбции пектиназы изменением pH среды путем растворения навески препарата (стандартизованного указанными наполнителями) не в дистиллированной воде, а в буферных растворах с pH 3,5—3,8. Следует указать, что pH сока лежит в пределах указанного значения pH.

Исследование осветления соков препаратом ферментов показало, что применение препарата пектиназы, стандартизованного диатомитом, способствует ускорению осветления ягодного сока.

Проведенными исследованиями установлено, что стандартизованные ферментные препараты могут храниться в полиэтиленовой или стеклянной таре не менее одного года без изменения активности.

Таким образом, приведенные данные показывают, что хотя такие наполнители, как бентонит или диатомит, ингибируют пектолитические ферменты вследствие хемосорбционных (адгезионных) явлений, но это ингибирование обратимо при растворении препарата в среде, имеющей pH осветленных соков 3,5—3,8.

Это доказывает необходимость некоторого изменения методики определения ферментативной активности препарата пектиназы.

В качестве наполнителей при стандартизации препаратов амилолитических ферментов можно рекомендовать хлористый натрий, крахмал или смесь крахмала с хлористым натрием (1 : 1), а также крахмала с сернокислым аммонием. Препараты протеолитических ферментов могут быть стандартизованы хлористым натрием, хлористым аммонием или сернокислым аммонием.

Препараты пектолитических ферментов следует стандартизовать диатомитом или лактозой.

Мы указывали выше, что применение некоторых наполнителей для стандартизации ферментных препаратов приводит к уменьшению ферментативной активности непосредственно после смешения препарата с наполнителем.

Чем же объясняется, что отдельные наполнители вызывают уменьшение ферментативной активности, а при определенных условиях, например изменении pH раствора, им можно вернуть первоначальную активность?

Так, стандартизация препарата пектиназы диатомитом, бентонитом или желатином приводит после непродолжительного хранения к уменьшению ферментативной активности на 70%, а при растворении стандартизованного препарата не в воде, а в буферном растворе с pH 3,5—4,0 исходная ферментативная

активность полностью восстанавливается. В других случаях, например при использовании аммонийных солей, происходит необратимая потеря амилолитической активности ферментного препарата.

Можно предположить, что наполнители, вызывающие «уменьшение» ферментативной активности, «освобождают» фермент после изменения pH среды в результате десорбции с контактных участков. Эти участки могут отличаться от участков, образующих фермент-субстратные комплексы.

Это может быть также объяснено наличием аллостерического центра, независимого от активного центра фермента, но обусловливающего высокую лабильность фермента и влияющего на создание и поддержание определенной конформации белковой молекулы.

Большая лабильность аллостерических участков по сравнению с непосредственно каталитической активностью может быть объяснена более высоким уровнем молекулярной структуры.

Можно предположить, что в ряде случаев возможна обратимость аллостерической специфичности, например при смешении препарата пектиназы с диатомитом, бентонитом в условиях изменения pH среды, а в отдельных случаях — необратимость конформаций аллостерических участков (действие аммонийных солей на амилолитические ферменты).

Таким образом, наполнители могут вызывать как обратимые, так и необратимые конфигурационные изменения аллостерических участков молекулы фермента, а могут и не оказывать никакого действия на аллостерическую специфичность ферментов.

Некоторые вещества стабилизируют аллостерические участки, т. е. способствуют уменьшению их лабильности, что наблюдается, например, при добавлении к препаратам амилолитических ферментов крахмала. Выше отмечалось, что применение в качестве наполнителей смеси крахмала с аммонийными солями приводит к сохранению ферментативной активности препарата, а стандартизация этих препаратов только солями аммония вызывает заметное уменьшение ферментативной активности.

При измельчении сырья и полупродуктов, стандартизации препаратов, а также на всех этапах технологического процесса производства ферментных препаратов необходимо соблюдение санитарно-гигиенических мероприятий, предусматривающих ведение процесса производства биологически активных веществ без бактериального заражения, а также без распыления как сырья, полупродуктов, так и вспомогательных материалов и готовых ферментных препаратов.

Остановимся лишь на процессах, связанных с осаждением взвешенных частиц.

Взвешенные в воздухе частицы сырья, культуры плесневых

грибов или ферментных препаратов имеют размеры от 0,1 до 100 *мкм*, т. е. являются грубодисперсными аэрозолями. Аэрозоли, размер частиц которых менее 0,1 *мкм*, называют высокодисперсными.

Мы указывали, что размер частиц ферментных препаратов лежит в пределах от 10 до 100 *мкм* (в основном 40—70 *мкм*). Споры бактерий культур плесневых грибов имеют размеры от 1 до 5 *мкм*.

Таким образом, в воздухе отдельных цехов ферментного завода могут находиться частицы размером от 1 до 100 *мкм*, которые образуют грубодисперсную аэрозольную систему.

Аэрозоли с частицами размером более 1 *мкм* заметно оседают под действием силы тяжести, а частицы аэрозоля, размер которых менее 1 *мкм*, обладают небольшой диффузионной способностью. Вследствие того что воздух обладает низкой вязкостью (0,000181 *спз* при 20° С) броуновское движение частиц, а следовательно, и диффузия их протекают весьма быстро.

Необходимо отметить, что наличие конвекционных потоков способствует перемещению аэрозольных частиц, которые не обладают агрегативной устойчивостью.

Их кинетическая устойчивость обусловлена размерами частиц, а мерой устойчивости является высота распределения частиц $\frac{dc}{dh}$.

Стокс показал, что скорость осаждения частиц зависит от их радиуса

$$v = \frac{2}{9} g \cdot \frac{d' - d_0}{\eta} \cdot r^2.$$

Данное уравнение получено исходя из того, что сила падения шарообразных частиц уравновешивается сопротивлением среды:

$$\frac{4}{3} \pi r^3 (d' - d_0)\, g = 6\pi\eta r v,$$

где η — вязкость среды, *пз*;

v — скорость движения частицы, $см \cdot сек^{-1}$, которая равна $\frac{h}{\tau}$ (здесь h — высота падения, *см*, τ — время, *сек*);

d' — плотность частиц;

d_0 — плотность среды (d_0 воздуха при 20° С—1,2047 *г/л* 0,00120 $г/см^3$). d для сырья и ферментных препаратов можно принять 1,4 $г/см^3$.

При взаимодействии аэрозольных частиц или при соударении о стенки происходит их слипание (коагуляция).

Мелкие частицы в полидисперсных аэрозолях увлекаются бо-

лее крупными и оседают вместе с ними. Осаждение монодисперсных аэрозолей протекает медленнее, чем полидисперсных.

Аэрозоли могут быть разрушены следующими путями.

Если размер частиц аэрозоля более 3 *мкм*, то успешно используются центробежные пылеотделители (циклоны), в которых частицы оседают на стенках неподвижных цилиндров. Широко также применяются различные фильтры (тканевые, асбестоцеллюлозные и др.) для осаждения на их поверхности частиц аэрозоля. В некоторых отраслях химической промышленности получили распространение электрофильтры.

В специальной камере частицы аэрозоля, проходя через коронный электрический разряд, приобретают большой отрицательный заряд и осаждаются на положительных электродах при напряжении электрического поля 100 000 *в*.

В производстве ферментных препаратов помимо герметизации отдельных процессов бороться с аэрозолями можно путем создания аспирации или применения различных фильтров и определенной влажности воздуха, а в отдельных случаях и смачивания путем орошения некоторых участков рабочего места.

* *
*

Амилолитические ферменты обладают меньшей стабильностью по сравнению с протеолитическими. Увеличение стабильности ферментного сиропа достигается как снижением температуры хранения, так и главным образом повышением концентрации сухих веществ.

Крахмал и лактоза замедляют скорость поглощения ферментными препаратами водяных паров. Наполнитель, используемый для стандартизации препаратов ферментов, не должен необратимо ингибировать ферменты. Крахмал оказывает стабилизирующее действие при хранении амилолитических ферментов. Показано, что после стандартизации препаратов пектолитических ферментов диатомитом, бентонитом или желатином ферментативную активность (пектиназы) следует определять после растворения препарата не в воде, а в буферном растворе с pH 3,5—4,0, что способствует десорбции фермента (аллостерического центра) с поверхности контактных участков наполнителя, т. е. возможна обратимость аллостерической специфичности. В отдельных случаях возможна необратимость конформации аллостерических участков (действие аммонийных солей на амилолитические ферменты). Наполнители могут вызывать также стабилизацию аллостерических участков (стандартизация крахмалом амилолитических ферментов).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Температура замерзания водио-спиртовых растворов

Содержаиие спирта, % вес.	Температура замерзания, °С	Содержаиие спирта, % вес.	Температура замерзания, °С
11,3	—5,0	39,0	—28,7
20,3	—10,6	46,3	—33,9
39,9	—18,9	56,1	—41,0

Криоскопическая постоянная водио-спиртовых растворов

Спирт, *г-моль*/1000 *г* воды	Молярная депрессия, *град/г-моль*	Спирт, *г-моль*/1000 *г* воды	Молярная депрессия, *град/г-моль*
0,02	1,83	10,0	2,2
0,1	1,83	15,0	2,0
1,0	1,83	20,0	1,8
2,0	1,83	30,0	1,4
3,0	1,84	40,0	1,2
4,0	1,93	50,0	1,0
6,0	2,05	70,0	0,9

Повышение точки кипеиия паточных сиропов при различиом содержаиии сухих веществ и различном вакууме (по сравнеиию с точкой кипеиия воды)

Сухие вещества, %	Вакуум, *мм рт. ст.*			
	91,51 (вода кипит при 50°С)	149,80 (вода кипит при 60°С)	355,10 (вода кипит при 80°С)	760,00 (вода кипит при 100°С)
25	0,18	0,19	0,22	0,26
30	0,27	0,28	0,33	0,38
35	0,33	0,35	0,40	0,50
40	0,45	0,48	0,55	0,63
45	0,57	0,61	0,70	0,80
50	0,74	0,79	0,91	1,03
55	1,02	1,09	1,25	1,40
60	1,40	1,51	1,74	1,95
65	1,95	2,07	2,38	2,70
70	2,62	2,81	3,21	3,65

Диэлектрическая проницаемость (диэлектрическая постоянная) спиртов при 20°С

Метиловый	33,7
Этиловый	25,8
Пропиловый	22,2
Амиловый	11,0

Соотношение между величиной диэлектрической постоянной и содержанием этилового спирта в растворе

ДП	Спирт, % об.	ДП	Спирт. % об.
80,5	0	67,08	29,8
80,88	0,70	62,02	40,0
80,06	1,37	56,00	50,0
79,40	2,31	51,68	57,8
78,08	5,48	43,54	68,2
75,80	9,77	37,06	77,04
72,86	9,17	32,32	86,07
		27,0	96,30

Характеристика сита в мешах (меш—число отверстий на 1 пог. дюйм сита)

Меш	Размер отверстий, *мм*	Меш	Размер отверстий, *мм*	Меш	Размер отверстий, *мм*
2,5	7,925	12	1,397	60	0,246
3,0	6,680	14	1,168	65	0,208
3,5	5,613	16	0,991	80	0,175
4	4,699	20	0,833	100	0,147
5	3,962	24	0,701	115	0,124
6	3,327	28	0,589	150	0,104
7	2,794	32	0,495	170	0,088
8	2,362	35	0,417	200	0,074
9	1,981	42	0,351		
10	1,651	48	0,295		

Ситовые шкалы

Характеристика сита по размерам сторон отверстий a

Номер сита	a, *мкм*	Номер сита	a, *мкм*	Номер сита	a, *мкм*
6	3360	40	420	140	105
12	1680	50	297	200	74
20	840	70	210	270	63
30	590	100	149		

Характеристика сита по числу отверстий на 1 $см^2$

Номер сита	Число отверстий на 1 $см^2$	Номер сита	Число отверстий на 1 $см^2$
75	900	200	6400
100	1600	225	8100
125	2500	250	10000
150	3600	275	16900
175	4900		

Характеристика ситовой шкалы, в которой номер сита равен числу отверстий на 1 *см*. Число отверстий на 1 $см^2$ равно квадрату номера сита

Номер сетки	Число отверстий на 1 $см^2$	Размер отверстий, *мм*	Номер сетки	Число отверстий на 1 $см^2$	Размер отверстий, *мм*
4	16	1,5	20	400	0,300
5	25	1,2	24	676	0,250
6	36	1,02	30	900	0,200
8	64	0,75	40	1600	0,150
10	100	0,60	50	2500	0,120
11	121	0,54	60	3600	0,102
12	144	0,49	70	4900	0,088
14	196	0,43	80	6400	0,075
16	256	0,385	100	10000	0,060

Соответствие между ситами, номера которых равны числу отверстий на 1 $см^2$ с числом меш

Число отверстий на 1 $см^2$	900	1600	2500	3600	4900	6400	10000
Меш	75	100	125	150	175	200	250

Объемный вес и углы естественного откоса (в *град* к горизонту) для материалов в свободно насыпанном состоянии

Материал	Влажность, %	Вес 1 $м^3$, *кг*	Угол откоса, *град*		Средний угол откоса, *град*
Картофель	Товарная	700—750	42	48	45
Кукуруза					
сухая	15	743	16,3	16,3	16,3
после замочки	45	748	28	32	28—32
Зародыши					
сухой	1,2	436	27	27	27
сырой	53	392	48	50	49
сырой до шнекпресса	69	570	48	49	48,5
дробленый	0,8	385	—	—	—
Корм					
сухой	7,7	375	29	32	30,3
сухой	12	423	28	31	29,7
сырой	63,6	573	41	43	42
полусухой	46,4	530	31	36	33
Мелкая мезга сухая	5,5	537	27	28	28
Крупная мезга					
сухая	6,81	200	27,5	30	28,5
после шнекпресса	60,3	157	49	49	49
сухая до шнекпресса	76,5	—	43	45	44,5
Глютен с фильтрпресса	57	607	37	38	37,5
Жмых					
молотый	4,0	539	30	34	32
немолотый	5,0	536	26	27	26,5
после прессов	2,88	558	—	—	—
Картофельный крахмал сухой сеяный	13—20	700	—	—	—
Крахмал					
центрифугированный	40	650	40	44	42
сырой	50	500	—	—	36
Крахмал кукурузный несеяный	11,27	545	—	—	—
Сода	11,6	527	32	34	33
Кизельгур					
без отсева	63,5	527	24	26	25
сеяный	48	496	37	41	39
Костяной уголь					
до мойки	19,4	1125	25	26	25,5
после мойки	19,0	1115	24	26	25
после прокаливания	0,6	1064	21	21	21

Вязкость картофельной крахмальной суспензии

Плотность, °Бр.	Вязкость (в *спз*) при температуре, °С		
	6	12	20
8,9	1,0075	1 0015	1,0035
18,6	1,086	1,06	1,046
30,0	1,263	1,211	1,165
37,2	2,14	1,935	1,753

Вязкость различных сортов пектина

Пектин	Влажность, %	μ	
		пз	Н·сек/м²
Абрикосовый	15,0	5,5	0,55
Апельсиновый, экстрагированный			
водой	9,0	32,0	3,20
щавелевой кислотой	16,0	1,6	0,16
Лимонный, экстрагированный			
водой	8,0	18,0	1,80
щавелевой кислотой	11,0	5,6	0,56
Подсолнечниковый . . .	10,6—11,5	3,7—4,3	0,37—0,43
Яблочный	9,4	17	0,16

Вязкость спиртов

Спирт	Вязкость (в *спз*) при температуре, °С								
	−20	−10	0	10	20	30	40	50	60
Метиловый	1,16	0,970	0,817	0,68	0,584	—	0,450	0,396	0,351
Этиловый	2,38	2,23	1,78	1,41	1,19	1,00	0,825	0,701	0,591
Пропиловый . .	6,9	5,1	3,85	2,89	2,20	1,72	1,38	—	0,92
Изобутиловый .	11,4	12,3	8,3	5,65	3,95	2,85	2,12	1,61	1,24
Изоамиловый . . .	—	—	8,6	6,1	4,36	3,20	2,41	1,85	0,93

Удельный вес картофельной мезги сырой

Содержание крахмала в абсолютно сухой мезге, %	При влажности мезги, %			
	80	85	90	95
50	1,0961	1,0720	1,0481	1,0240
55	1,0995	1,0746	1,0497	1,0249
60	1,1029	1,0772	1,0514	1,0257
65	1,1063	1,0797	1,0531	1,0264
70	1,1097	1,0822	1,0548	1,0274
75	1,1130	1,0847	1,0565	1,0283

Удельный вес декстрина

Кукурузного . . . . 1,510—1,5218
Картофельного . . . . 1,571—1,5285

Удельный вес (d_4^{20}) этилового спирта при различной температуре

Температура, °C	Удельный вес, г/см³	Температура, °C	Удельный вес, г/см³	Температура, °C	Удельный вес, г/см³	Температура, °C	Удельный вес, г/см³
0	0,80623	10	0,79779	20	0,78927	30	0,78082
1	0,80539	11	0,79695	21	0,78842	—1	0,8071
2	0,80454	12	0,79610	22	0,78756	—2	0,8079
3	0,80369	13	0,79525	23	0,78670	—3	0,8088
						—4	0,8096
4	0,80285	14	0,79440	24	0,78525	—5	0,8105
5	0,80200	15	0,79356				
6	0,80116	16	0,79271	25	0,78500	—6	0,8113
7	0,80032	17	0,79185	26	0,78416	—7	0,8122
8	0,79948	18	0,79100	27	0,78333	—8	0,8130
9	0,79864	19	0,79014	28	0,78250	—9	0,8139
				28	0,78166		

Удельный вес изопропилового спирта

Концентрация, % вес.	При 15 °C	При 20 °C
20	0,9719	0,9703
50	0,9104	0,9069
55	0,8988	0,8946
60	0,8869	0,8825
70	0,8634	0,8584
80	0,8403	0,8397
85	0,8278	0,8219
90	0,8161	0,8096
100	0,7891	0,7854

Теплопроводность этилового спирта, *ккал/(м·ч·град)*

Жидкость		Пары	
температура, °C	теплопроводность	температура, °C	теплопроводность
0	16,25	7,5	0,0107
25	15,75	20,0	0,0121
50	15,25	100,0	0,0168
75	14,75		

Теплопроводность водно-спиртовых растворов
ккал/(м·ч·град)

Содержание спирта, % вес.	Коэффициент теплопроводности при температуре, °C	
	0	80
10	0,434	0,547
20	0,385	0,498
30	0,345	0,458
40	0,300	0,415
50	0,252	0,364
60	0,216	0,328
70	0,185	0,298

Перевод температуры, выраженной в градусах одной шкалы, в градусы другой (n — одно и то же число в левой и правой части каждого равенства)

$$n\,^\circ\mathrm{C} = \frac{4}{5} n\,^\circ\mathrm{R} = \left(\frac{9}{5} n + 32\right) {}^\circ\mathrm{F} = (n + 273{,}2)\ {}^\circ\mathrm{K}.$$

$$n\,^\circ\mathrm{R} = \frac{5}{4} n\,^\circ\mathrm{C} = \left(\frac{9}{4} n + 32\right) {}^\circ\mathrm{F} = \left(\frac{5}{4} n + 273{,}2\right) {}^\circ K.$$

$$n\,^\circ\mathrm{F} = \frac{5}{9}(n - 32)\ {}^\circ\mathrm{C} = \frac{4}{9}(n - 32)\ {}^\circ\mathrm{R} = \left[\frac{5}{9}(n - 32) + 273{,}2\right] {}^\circ\mathrm{K}.$$

$$n\,^\circ\mathrm{K} = (n - 273{,}2)\ {}^\circ\mathrm{C} = \frac{4}{5}(n - 273{,}2)\,^\circ\mathrm{R} = \left[\frac{9}{5}(n - 273{,}2) + 32\right] {}^\circ\mathrm{F}.$$

Шкала	C	R	F	K
Температура кипения воды (при нормальном атмосферном давлении 760 *мм*), °	100	80	212	373,2
Температура плавления льда (при нормальном атмосферном давлении 760 *мм*), °	0	0	32	273,2

Охлаждающие смеси

A — число весовых частей соли на 100 весовых частей воды или снега;
t — максимально низкая температура, которой можно достигнуть в результате смешения, °С.

Соль и вода
(температура соли и воды перед смешением 10—15 °С)

Соль	*A*	*t*	Соль	*A*	*t*
NH_4Cl	30	—5,1	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	250	—12,4
$NaNO_3$	75	—5,3	NH_4NO_3	60	—13,6
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	110	—8,0	NH_4SCN	133	—18,0

Соль и снег
(перед смешением температура доводится до 0 °С)

Соль	*A*	*t*	Соль	*A*	*t*
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	41	—9,0	NH_4Cl	25	—15,8
$CaCl_2$	30	—11	NH_4NO_3	60	—17,3
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	67,5	—11,0	$NaCl$	33	—21,2
KCl	30	—11	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	143	—55

Температура кипения воды при различных давлениях

P, мм рт. ст	*t*, °С	*P, мм. рт. ст*	*t*, °С	*P, мм. рт. ст.*	*t*, °С
680	96,9	720	98,5	760	100,0
685	97,1	725	98,7	765	100,2
690	97,3	730	98,9	770	100,4
				775	100,6
695	97,5	735	99,1	780	100,7
700	97,7	740	99,3	785	100,9
705	97,9	745	99,5	790	101,1
		750	99,6		
710	98,1	755	99,8	800	101,5
715	98,3				

P, атм	t, °C	P, атм	t, °C
1	100	6	159,2
2	120,6	7	165,3
3	133,9	8	170,8
4	144,0	9	175,8
5	152,0	10	180,3

pH растворов различных концентраций

Нормальность раствора HCl	pH	Нормальность раствора NaOH	pH
1,0	0,1	Вода	7
0,1	1,1	0,000001	8
0,01	2,0	0,00001	9
0,001	3,0	0,0001	10
0,0001	4,0	0,001	11
0,00001	5,0	0,01	12
0,000001	6,0	0,1	13
Вода	7,0	1,0	14

pH растворов углекислоты (при 23 °С)

CO_2, *мг/л*	pH	CO_2, *мг/л*	pH	CO_2, *мг/л*	pH
690	4,16	16	4,98	3,0	5,34
315	4,31	9,0	5,10	2,8	5,35
178	4,36	6,1	5,19	2,6	5,37
90	4,61	4,4	5,26	2,4	5,39
55	4,71	3,6	5,31	2,2	5,41
24	4,89				

Буферные растворы

Боратные смеси

0,05Н $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (19,072 *г/л*), *мл*	0,1н. HCl, *мл*	pH при 18 °С
5,25	4,75	7,62
5,50	4,50	7,94
5,75	4,25	8,14
6,0	4,0	8,29
6,5	3,5	8,51
7,0	3,0	8,68
7,5	2,5	8,80
8,0	2,0	8,91
8,5	1,5	9,01
9,0	1,0	9,09
9,5	0,5	9,17
10,0	0,0	9,24

Фосфатные смеси

pH	1/15н.KH_2PO_4 (9,078 г/л), мл	1/15н.Na_2HPO_4 (11,876 г/л), мл	pH	1/15н.KH_2PO_4 (9.078 г/л), мл	1/15н.$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (11,876 г/л), мл
4,94	9,9	0,1	6,98	4,0	6,0
5,29	9,75	0,25	7,17	3,0	7,0
5,59	9,50	0,50	7,38	2,0	8,0
5,91	9,0	1,0	7,73	1,0	9,0
6,24	8,0	2,0	8,04	0,5	9,5
6,47	7,0	3,0	8,34	0,25	9,75
6,64	6,0	4,0	8,67	0,1	9,9
6,81	5,0	5,0	9,18	0,0	10,0

Растворимость в воде некоторых химических соединений в г сухого вещества на 100 г воды

Вещество	Химическая формула	Растворимость	
		при 15 °C	при 100 °C
Аммоний азотнокислый	NH_4NO_3	173	871
Аммоний сернокислый	$(NH_4)_2\ SO_4$	74,2	103,3
Аммоний хлористый	NH_4Cl	35,3	77,3
Борная кислота	H_3BO_3	4,3	40
Едкий натр	NaOH	105	340
Калий азотнокислый	KNO_3	26,3	246
Калий двухромовокислый	$K_2Cr_2O_7$	9	95
Калий иодистый	Kj	140	208
Калий марганцевокислый	$KMnO_4$	5,4	22,2 (60°)
Калий хлористый	KCl	32,5	56,7
Натрий двууглекислый	$NaHCO_3$	8,9	16,4 (60°)
Натрий сернокислый	$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$	13,1	42
Натрий углекислый	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	17	45
Натрий хлористый	NaCl	35,9	39,8
Сахар тростниковый	$C_{12}H_{22}O_{11}$	197	487
Свинец азотнокислый	$Pв\ (NO_3)_2$	52,4	138,8
Серебро азотнокислое	$AgNO_3$	196	952

ЛИТЕРАТУРА

Аганесова Л. Н., Малченко А. Л. Поверхностное натяжение ферментных растворов. «Ферментная и спиртовая промышленность», № 1, 1964; Вязкость и плотность ферментных растворов. «Спиртовая промышленность», № 7, 1963.

Аккерман Ю. Биофизика. Изд-во «Мир», 1964.

Афанасьев П. В. О природе ферментативной активности. «Биохимия». Т. 14. 1949.

Батцер Г. Введение в химии высокомолекулярных соединений. ИЛ, 1960.

Бейли Дж. Методы химии белков. Изд-во «Мир», 1965.

Билай В. И. Биологически активные вещества микроскопических грибов. Киев, 1965.

Браунштейн А. Е. Активные центры и природа каталитического действия ферментов. Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева. Т. VIII. Вып. 1. 1963.

Брей Дж. и Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. М., ИЛ, 1959.

Бреслер С. А., Введение в молекулярную биологию. М.—Л., Изд-во АН СССР. 1963.

Веселов И. Я., Чукмасова М. А. Технология пива. 2-е изд. Пищепромиздат, 1963.

Веселов И. Я., Салманова Л. С. Разработка технологии получения стабилизатора для пива. Труды ВНИИППа. Вып. VII. 1959.

Гинзбург А. С. Сушка пищевых продуктов. Пищепромиздат, 1960.

Гиссбах Р. Теория и практика ионного обмена. ИЛ, 1963.

Глнкман С. А. Введение в физическую химию высокополимеров. Изд. Саратовского Государственного университета, 1959.

Гулый М. Ф., Билай В. Н., Пидопличко Н. М., Дегтярь Р. Г., Никольская Е. А. Фермеит глюкозооксидаза и его применение. Изд-во АН УССР, 1964.

Диксон М. и Уэбб. Ферменты. ИЛ, 1961.

Иванов И. Д. Полярография белков, энзимов и аминокислот. Докторская диссертация. М., 1962.

Имшенецкий А. А. Микробиология целлюлозы. Изд-во АН СССР. М., 1953.

Каверзнева Е. Д., Рассулин Ю. А. Выделение и очистка протеазы. «Биохимия». Т. 29. Вып. 6. 1964.

Каргин В. А., Слонимский Г. Л. Краткие очерки по физико-химии полимеров. Изд-во МГУ, 1960.

Калашннков Е. Я. Производство амилолитических и протеолитических ферментов и их применение в пивоваренной промышленности. ГОСИНТИ, 1959.

Калунянц К. А. Выделеиие и концентрирование ферментов. М., ЦИНТИПищепром, 1963.

Каргин В. А., Слонимский Г. Л. Краткие очерки по физико-химии полимеров. Изд. МГУ, 1960.

Касаткин А. Г. Основные процессы и аппараты химической технологии М., Госхимиздат, 1960.
Климовский Д. Н. и Родзевич В. И. Метод определения качества солода. Труды ВНИИСПа. Вып. II. 1952.
Кретович В. Л. Современные представления о природе и механизме действия ферментов. «Известия АН СССР». Серия биологическая, 1961, № 3.
Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М., Изд-во «Высшая школа», 1961.
Липатов С. М. Физико-химия коллоидов. ГНТИ, 1948.
Лыков А. В. Тепло-массообмен в процессах сушки. Госэнергоиздат, 1956.
Кульман А. Г. Физическая и коллоидная химия. Пищепромиздат, 1963.
Мэлвин-Хьюз Э. А. Физическая химия. М., ИЛ, 1962.
Нейландс Дж., Штумер П. Очерки по химии ферментов. ИЛ, 1958.
Николаев Л. А. Биокатализаторы и их моделирование. Изд-во «Высшая школа», 1964.
Нортроп Д., Кунитц М., Херриот Р. Кристаллические ферменты. М., ИЛ, 1950.
Ольшанова К. М., Копылова В. Д., Морозова Н. М. Осадочная хроматография. М., Изд-во АН СССР, 1963.
Опарин А. И. Возникновение жизни на земле. Изд-во АН СССР, 1957.
Островский А. И. Общая технология пищевых веществ. Пищепромиздат, 1959.
Пасынский А. Г. Биофизическая химия. М., Изд-во «Высшая школа», 1963. Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. Доклады (с дискуссиями) на симпозиуме 1959 г. Пищепромиздат, 1963.
Покровская Н. В., Воробьева М. Г. Разработка способов получения препаратов глюкозооксидазы. Труды ЦНИИПБиВП. Вып. IX. 1962.
«Проблемы эволюционной и технической биохимии». К 70-летию акад. А. И. Опарина. Изд-во «Наука», М., 1964.
Пронин С. И. Амилолитические ферменты и их роль в пищевой промышленности. М., Гизлегпищепром, 1953.
Пюльман Б. и Пюльман А. Квантовая биохимия. Изд-во «Мир», 1965.
Рачинский В. В. Введение в общую теорию динамики, сорбции и хроматографии. Изд-во «Наука», 1964.
Ребиндер П. А. Поверхностно-активные вещества и их применение. «Химическая наука и промышленность» ВХО им. Д. И. Менделеева. Т. IV. Вып. 5. 1959.
Ребиндер П. А. Поверхностно-активные вещества. Изд-во «Знание», 1961.
Ребиндер П. А. Поверхностные и объемные свойства растворов и поверхностно-активных веществ. Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева № 4, 1966.
Реутов О. А. Теоретические проблемы органической химии. Изд-во МГУ, 1956.
Салдадзе К. М., Пашков А. Б., Титов В. С. Ионообменные высокомолекулярные соединения. Госхимиздат, 1960.
Самнер Б., Сомерс. Химия ферментов и методы их исследования. М., ИЛ, 1948.
Самсонов Г. В. Сорбция и хроматография антибиотиков. Изд-во АН СССР, 1960.
Сетлоу Р., Полорд Э. Молекулярная биофизика. М., ИЛ, 1964.

Силин П. М. Технология свеклосахарного и рафинадного производства. Пищепромиздат, 1958.
Уоллен А., Стодола Ф., Джексон Р. Типовые реакции ферментативной химии. М., ИЛ, 1962.
Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. Изд-во «Мир», М., 1966.
Феникова Р. В. Получение концентрированных ферментных препаратов. ЦИНТИПищепром, 1960.
Феникова Р. В. Докторская диссертация. М., 1958.
Ферменты. Под ред. А. Е. Браунштейна. Изд-во «Наука», 1964.
Фертман Г. И., Шульман М. С. Физико-химические основы производства спирта. Пищепромиздат, 1960.
Цыперович А. С. Ферменты в народном хозяйстве. Киев. Изд-во «Техника», 1965.
Цыперович А. С. Исследование денатурации и стабилизации глобулярных белков. Докт. дисс. Киев, 1954.
Шульман М. С. Сорбция амилолитических ферментов. Изд-во «Пищевая промышленность», 1966.
Шульман М. С. Механическая клейстеризация крахмала. Труды ЦНИИСПа. Вып. X. 1961.
Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. Изд-во «Наука», М., 1965.

ОГЛАВЛЕНИЕ


19

68 к.

5фо 8310150 м.